



UNIVERSIDADE DA CORUÑA

Programa de Doctorado en Ciencias de la Salud

TESIS DOCTORAL

**Células madre pluripotentes inducidas:  
generación, caracterización y aplicaciones en  
el estudio y tratamiento de la artrosis**

**Rocío Castro Viñuelas**

**A Coruña, 2019**

*Directores:*

*Silvia María Díaz Prado*

*Isaac Manuel Fuentes Boquete*



La **Dra. Silvia María Díaz Prado** y el **Dr. Isaac Manuel Fuentes Boquete**, profesores del Área de Anatomía y Embriología Humana del Departamento de Fisioterapia, Medicina y Ciencias Biomédicas de la Universidade da Coruña,

CERTIFICAN QUE:

La presente memoria de tesis titulada “**Células madre pluripotentes inducidas: generación, caracterización y aplicaciones en el estudio y tratamiento de la artrosis**” presentada por Doña Rocío Castro Viñuelas ha sido realizada bajo nuestra dirección y reúne las condiciones necesarias de originalidad y rigor científico para ser defendida públicamente y optar al Grado de Doctor internacional.

Para que así conste, firman el presente certificado en A Coruña, a 13 de febrero de 2019.

Fdo.: Silvia M<sup>a</sup> Díaz Prado

Fdo.: Isaac Manuel Fuentes Boquete

Fdo.: Rocío Castro Viñuelas  
(*Doctoranda*)







## UNIVERSITY OF GOTHENBURG

Parte de la investigación incluida en esta tesis ha sido realizada durante una estancia de investigación predoctoral en el año 2017 en el *Department of Clinical Chemistry and Transfusion Medicine* del *Institute of Biomedicine, Sahlgrenska University Hospital* (Gotemburgo, Suecia), bajo la supervisión de la profesora Stina Simonsson y el profesor Anders Lindahl, investigadora postdoctoral y líder del grupo de investigación *Molecular Cell Biology and Regenerative Medicine*, respectivamente.



*"Great works are performed not by strength but by perseverance"*

*Samuel Johnson*

***A mi padrino, sé que estarías orgulloso de mi***

***A mis padres, por su amor incondicional***

***A mi hermana, por ser mi ejemplo a seguir***

***A Andrés, por estar siempre conmigo***



*Todavía no puedo creer que me encuentre escribiendo estas líneas. ¿Cómo es posible que el tiempo haya pasado tan rápido? Aún recuerdo con añoranza las primeras clases de Ciencias Naturales en el colegio, cómo me cautivó la manera en la que mis profesores explicaban la biología de las células y, en definitiva, el funcionamiento de la vida. Después vino la Universidad, donde el maravilloso, a la par que complicado mundo de la investigación, se cruzó en mi camino. A lo largo de estos años han sido innumerables las personas que me han brindado su tiempo, su ayuda y su apoyo y que, por lo tanto, aunque sea en unas pocas líneas, quisiera agradecer.*

*En primer lugar, me gustaría darles las gracias a los donantes de las muestras. Sin su altruismo, nada de lo que está escrito a continuación habría sido posible.*

*En segundo lugar, me gustaría agradecer a todas las instituciones que con su financiación hicieron posible la realización de este proyecto: Fundación Española de Reumatología, Instituto de Salud Carlos III, Rede Galega de Terapia Celular y Grupos con Potencial de Crecemento, Xunta de Galicia y Fondo Social Europeo, Deputación da Coruña y CIBER-BBN.*

*Gracias también a mis profesores, a todos ellos, gracias por transmitirme vuestros conocimientos y la pasión por aprender.*

*Quisiera darle las gracias a mis directores de tesis, la Dra. Silvia Díaz Prado y el Dr. Isaac Fuentes Boquete. Gracias por confiar en mí desde el primer día, por apoyarme en los momentos difíciles y por invertir vuestro tiempo en mí. Gracias por abrirme las puertas de la docencia universitaria y por ser el paraguas que paró muchos chaparrones.*

*Me gustaría agradecer también al director científico del INIBIC, el Dr. Francisco Blanco, por poner a mi alcance todos los medios y recursos disponibles para formarme como Doctora y para que este trabajo pudiera realizarse.*

*Al Dr. Francisco Javier de Toro Santos, por su apoyo y por la ilusión con la que mira este proyecto.*

*A los Servicios Centrales de Histomorfología y el Servicio de Genómica del INIBIC, los Servicios de Apoyo a la Investigación de la Universidad de A Coruña, el Servicio de Genética del Complejo Hospitalario Universitario de La Coruña y el Servicio de Radiofísica del Centro Oncológico de Galicia, por su ayuda con los análisis de las muestras y la irradiación de las células.*

*Gracias a todos y cada uno de los investigadores e investigadoras de los distintos grupos del INIBIC, incluso los que ya no trabajan aquí. Todos habéis formado parte de*

*este proceso, lo habéis sufrido conmigo y bien directa o indirectamente me habéis ayudado a llegar hasta el final. Desde vuestra ayuda para realizar un envío, hacer un pedido o desatascar la impresora, hasta ayudarme con los geles de PCR, el citómetro, el microscopio o los análisis de las secuencias. No puedo nombraros uno por uno porque entonces la tesis tendría 400 páginas. Gracias por vuestra generosidad, por responder a mis dudas, por estar dispuestos a ayudarme siempre que lo necesité, por despejarme la mente en esas sobremesas en la cocina, por hacer de los congresos viajes inolvidables, por vuestros consejos y palabras de ánimo... gracias de verdad.*

*Gracias también a mis compañeras de grupo, María y Silvia, por permitirme tener algún respiro en el demandante mundo del cultivo de las iPSCs. También al Dr. Carlos Vaamonde, Charlie, gracias por poner la nota alegre a todas las situaciones. A la Dra. Clara Sanjurjo. Mi Clarich, ¡lo conseguimos! Mi agradecimiento hacia ti es especial, ya que no habría podido arrancar esta tesis sin ti. Has estado conmigo desde el día en el que puse el primer pie en el laboratorio. Gracias por tu ayuda, por animarme a no rendirme cuando las células no querían crecer y por ser una buena compañera. A la Dra. Tamara Hermida. Tami, tú también mereces una mención especial. Gracias por animarme en los momentos difíciles y por confiar en mí como nadie. Me has cuidado, ayudado y enseñado durante estos años como sólo tu podrías hacerlo. Gracias.*

*Recuerdo el día antes de empezar en el laboratorio preguntándome si durante el tiempo que estuviera trabajando allí, haría algún amigo. Ahora lo pienso y me entra la risa al pensar en vosotros. Sí, daros por aludidos porque sabéis quienes sois. Paula y Juan, mis londoners, cuánto os hecho de menos. Vivimos muchas cosas en este tiempo, desde la intoxicación con los picatostes de Juan hasta casi morir de un infarto cuando tuvimos que evacuar el centro comercial de Canary Wharf. Gracias por animarme siempre, por ayudarme y por confiar en mí. A las nuevas incorporaciones, Amanda, Álex e Irene, por apuntarse a un bombardeo y por devolverme la alegría en las horas bajas. A María, Camachi, gracias por ofrecerme ayuda siempre que está en tu mano y por cambiarme las guardias sin rechistar, aunque supieses que entonces te tocaría muestra. A Adri, porque cuando no estás la vida es menos divertida. A mi Marti. Desde que te conocí he admirado tu dedicación, tu fuerza y tu tesón. Debajo de ese cascarón malhumorado yo he encontrado una amiga de verdad. Gracias por confiar en este trabajo incluso cuando yo no lo hacía; gracias por escucharme y por enseñarme siempre cosas nuevas. Estoy segura de que vas a conseguir todo lo que te propongas.*

*I would also like to thank all the team members of the group Molecular Cell Biology and Regenerative Medicine from the University of Gothenburg. I especially give thanks to Prof. Anders Lindahl for giving me the opportunity of being part of such an amazing research. To Prof. Stina Simonsson for guiding and supporting me during my stay. I would also like to thank my friends, Jef, Märta, Jasmine, Alba, Ana, Tuğçe, Leonie, Niamh, Conor, Kian, Moira, Sinead and my "Swedish family", María, Lars and Ingrid. Thanks to all of you I felt like home even when I was far away from Spain.*

*A mis compañeros de carrera, mis chicos de PMCEX, por haber compartido conmigo tantas aventuras.*

*Me gustaría dar las gracias a mi familia. Especialmente a tres personas que, por desgracia, no van a poder leer esta tesis. Padrino, abuela, abuelo, os llevo en mi corazón, hoy y siempre; esta tesis es vuestra. Al resto de mi familia y que afortunadamente celebran hoy conmigo el fin de esta etapa. Tías, tíos, abuela y primos. Gracias por la ilusión con la que me miráis cada vez que os explico lo que hago, aunque a veces no lo entendáis del todo; por alegraros por todas las cosas buenas que me pasan y por confiar en mí más de lo que yo lo hago.*

*A Andrés, mi Taber. Te quiero, te admiro y sé que conseguirás todo lo que te propongas. Empezamos juntos esta etapa y sé que sin ti hoy no estaría aquí. Gracias por ser mi apoyo y mi abrigo ante las adversidades. Por creer en mí y estar a mi lado. Por tu paciencia, cariño y ayuda incondicional. Gracias por enseñarme a no rendirme cuando las cosas se torcían, a esforzarme y ser perseverante. Aunque no sepamos que nos depara el futuro estoy segura de que todo irá bien a tu lado.*

*A mi hermana. Sabe, no eres consciente de la importancia que has tenido para que hoy esté donde estoy. Tú has sido mi ejemplo y mi inspiración. Eres fuerte, valiente, perseverante y decidida. Has luchado por tus sueños hasta conseguirlos y por eso estoy orgullosa de ti. Espero que tú también lo estés de mí. Gracias por comprenderme, quererme y animarme en los momentos tristes. En definitiva, gracias por ser la mejor hermana que alguien podría desear.*

*Y por último, pero no menos importante, me gustaría darle las gracias a mis padres. Papá, gracias por enseñarme a ser paciente y hacerme valer. Por llevarme y recogerme en el laboratorio las veces que hiciese falta, aunque fuese fin de semana. Gracias por la cara de felicidad que, sin querer, se te pone cuando presumes de tener una hija “científica” y por querer siempre lo mejor para mí. Mamá, me haría falta una vida entera para agradecerte todo lo que haces por mí. Gracias por tu dedicación, por tu apoyo y por interesarte cada día en el avance y desarrollo de esta tesis. Por tu preocupación los días que me dolía el brazo de pasarme horas picando células. Y lo más importante, gracias por tu amor incondicional, por tu comprensión y por animarme a cumplir mis sueños. Por esos cafés en tu compañía que curan las penas y por darme alas para volar. Gracias por darme la vida y por enseñarme a vivirla.*

*A todos vosotros, os doy las gracias de corazón.*

*Os quiero,*

**Rocío**





# ÍNDICE



<b>ÍNDICE</b>	<b>XIII</b>
<b>LISTADO DE ABREVIATURAS</b>	<b>XIX</b>
<b>ÍNDICE DE FIGURAS</b>	<b>XXV</b>
<b>ÍNDICE DE TABLAS</b>	<b>XXIX</b>
<b>RESUMEN</b>	<b>XXXI</b>
<b>I. INTRODUCCIÓN</b>	<b>1</b>
<b>1. EL CARTÍLAGO ARTICULAR</b>	<b>1</b>
1.1. Composición	1
1.1.1. Condrocitos	1
1.1.2. Matriz extracelular	2
1.1.2.a. Colágeno	2
1.1.2.b. Proteoglicanos	2
1.2. Estructura	3
1.3. Integridad del cartílago articular	4
<b>2. ARTROSIS</b>	<b>5</b>
2.1. Prevalencia y factores de riesgo	5
2.2. Manifestaciones clínicas	6
2.2.1. Artrosis de manos	6
2.2.1.a. Tipos de artrosis de manos	7
2.2.1.b. Componente genético en la artrosis de manos	9
<b>3. CÉLULAS MADRE</b>	<b>10</b>
3.1. Clasificación	10
3.2. Células madre pluripotentes	11
3.3. Inducción de la pluripotencia: células madre pluripotentes inducidas o <i>iPSCs</i>	11
3.3.1. Eficiencias de reprogramación	13
3.3.2. Factores de transcripción en el proceso de reprogramación	14
3.3.3. Sistemas de reprogramación	15
3.3.3. Cultivo y caracterización de las <i>iPSCs</i>	17
3.3.3.a. Cultivo	17
3.3.3.b. Caracterización	18
3.3.4. Aplicaciones de las <i>iPSCs</i>	19
<b>4. CÉLULAS MADRE PLURIPOTENTES INDUCIDAS EN EL ESTUDIO Y TRATAMIENTO DE LA ARTROSIS</b>	<b>20</b>
4.1. Estrategias para la diferenciación condrogénica de las <i>iPSCs</i>	20
4.2. Aplicaciones de las <i>iPSCs</i> en el estudio y tratamiento de la artrosis	21
4.2.1. <i>iPSCs</i> en el modelado <i>in vitro</i> de la artrosis	22
4.2.2. <i>iPSCs</i> en el testado de fármacos en la artrosis	22
4.2.3. <i>iPSCs</i> en la medicina regenerativa del cartílago	23
4.2.3.a. Impresión 3D de <i>iPSCs</i>	25
<b>II. JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS</b>	<b>27</b>
<b>III. MATERIAL Y MÉTODOS DEL OBJETIVO 1</b>	<b>31</b>
<b>1. OBTENCIÓN DE CÉLULAS SOMÁTICAS PARA EL PROCESO DE REPROGRAMACIÓN</b>	<b>33</b>
1.1. Obtención y procesamiento de biopsias de piel humana	33
1.2. Aislamiento y cultivo de fibroblastos dermales	34
1.3. Caracterización de fibroblastos dermales obtenidos de biopsias de piel humana	35
<b>2. CULTIVO DE CÉLULAS ALIMENTADORAS O CÉLULAS FEEDER</b>	<b>35</b>
2.1. Análisis de ciclo celular para el establecimiento de la dosis efectiva de radiación	36
2.2. Congelación y almacenamiento de las células <i>feeder</i>	36

<b>3. REPROGRAMACIÓN NO INTEGRATIVA DE FIBROBLASTOS DERMAL PARA GENERAR <i>iPSCs</i></b>	<b>37</b>
<b>4. CULTIVO Y EXPANSIÓN DE LAS <i>iPSCs</i> GENERADAS</b>	<b>38</b>
4.1. Cultivo de las <i>iPSCs</i> sobre células alimentadoras o <i>feeders</i>	38
4.2. Cultivo de las <i>iPSCs</i> libre de células alimentadoras o <i>feeders</i>	39
<b>5. CARACTERIZACIÓN DE LAS <i>iPSCs</i> GENERADAS</b>	<b>43</b>
5.1. Estudio de la actividad fosfatasa alcalina	43
5.2. Análisis de expresión génica	43
5.2.1. Extracción y cuantificación de ARN	43
5.2.2. Síntesis de ADN complementario	44
5.2.3. <i>PCR</i> cuantitativa en tiempo real	44
5.3. Estudio de la capacidad de diferenciación <i>in vitro</i> de las <i>iPSCs</i> hacia las tres capas germinales: endodermo, ectodermo y mesodermo	45
5.4. Análisis inmunohistoquímico de las <i>iPSCs</i> generadas	47
5.4.1. Estudio de marcadores de pluripotencia en las colonias de <i>iPSCs</i>	47
5.4.2. Estudio de marcadores característicos de las capas germinales en las <i>iPSCs</i> diferenciadas <i>in vitro</i>	48
5.5. Análisis del cariotipo	48
5.6. Comprobación de la autenticidad de las líneas de <i>iPSCs</i> generadas	49
<b>6. ESTUDIO DE POLIMORFISMOS DE UN SOLO NUCLEÓTIDO ASOCIADOS A LA ARTROSIS DE MANOS</b>	<b>49</b>
6.1. Extracción de ADN y amplificación mediante <i>PCR</i>	49
6.2. Purificación de los productos de <i>PCR</i> y secuenciación Sanger	51
<b>7. DIFERENCIACIÓN CONDRÓGENICA <i>IN VITRO</i> DE LAS <i>iPSCs</i> GENERADAS A TRAVÉS DEL ESTADÍO DE <i>MSCs</i></b>	<b>51</b>
7.1. Diferenciación <i>in vitro</i> de las <i>iPSCs</i> hacia células similares a <i>MSCs</i>	52
7.2. Caracterización de las células similares a <i>MSCs</i> generadas	52
7.2.1. Estudio de marcadores de superficie asociados a <i>MSCs</i> mediante citometría de flujo	53
7.2.2. Diferenciación adipogénica <i>in vitro</i>	54
7.2.3. Diferenciación osteogénica <i>in vitro</i>	55
7.3. Diferenciación <i>in vitro</i> de las células similares a <i>MSCs</i> hacia condrocitos	56
<b>III. MATERIAL Y MÉTODOS DEL OBJETIVO 2</b>	<b>59</b>
<b>1. LÍNEA DE <i>iPSCs</i> A2B</b>	<b>61</b>
1.1. Expansión y cultivo de la línea celular de <i>iPSCs</i> A2B	61
1.2. Comprobación de la presencia del marcador de pluripotencia <i>Oct4</i>	62
<b>2. IMPRESIÓN TRIDIMENSIONAL</b>	<b>62</b>
2.1. Preparación de las biotintas para la impresión 3D	62
2.2. Impresión 3D de la línea de <i>iPSCs</i> A2B	63
<b>3. DIFERENCIACIÓN CONDRÓGENICA <i>IN VITRO</i> DE LOS CONSTRUCTOS 3D</b>	<b>65</b>
<b>4. ESTUDIO DE LA VIABILIDAD CELULAR EN LOS CONSTRUCTOS 3D CULTIVADOS <i>IN VITRO</i></b>	<b>65</b>
<b>5. EVALUACIÓN DE LA DIFERENCIACIÓN CONDRÓGENICA <i>IN VITRO</i> DE LOS CONSTRUCTOS 3D</b>	<b>66</b>
5.1. Análisis histológico de la diferenciación condrogénica	66
5.2. Análisis molecular de la diferenciación condrogénica	67
5.2.1. Extracción y cuantificación de ARN	67
5.2.2. Síntesis de ADN complementario	68
5.2.3. <i>PCR</i> cuantitativa en tiempo real	68
<b>IV. RESULTADOS DEL OBJETIVO 1</b>	<b>71</b>
<b>1. AISLAMIENTO Y CARACTERIZACIÓN DE FIBROBLASTOS DERMAL HUMANOS</b>	<b>73</b>
<b>2. ESTABLECIMIENTO DE LA DOSIS EFECTIVA DE RADIACIÓN PARA EL CULTIVO DE CÉLULAS ALIMENTADORAS O <i>FEEDERS</i></b>	<b>74</b>
<b>3. REPROGRAMACIÓN NO INTEGRATIVA DE LOS FIBROBLASTOS DERMAL</b>	<b>75</b>

<b>4. PUESTA A PUNTO DEL CULTIVO DE LAS <i>IPSCs</i> EN SISTEMA LIBRE DE CÉLULAS ALIMENTADORAS O <i>FEEDERS</i></b>	<b>76</b>
<b>5. CARACTERIZACIÓN DE LAS <i>IPSCs</i> GENERADAS</b>	<b>81</b>
5.1. Actividad fosfatasa alcalina	81
5.2. Análisis de expresión génica	82
5.3. Análisis histológico de marcadores de pluripotencia en las colonias de <i>iPSCs</i>	84
5.4. Análisis histológico de la diferenciación de las <i>iPSCs</i> hacia endodermo, mesodermo y ectodermo	85
5.5. Análisis del cariotipo y autenticidad de las líneas de <i>iPSCs</i> generadas	87
<b>6. ESTUDIO DE POLIMORFISMOS DE UN SOLO NUCLEÓTIDO ASOCIADOS A LA ARTROSIS DE MANOS EN LAS LÍNEAS DE <i>IPSCs</i> GENERADAS</b>	<b>88</b>
<b>7. DIFERENCIACIÓN CONDRÓGENICA <i>IN VITRO</i> DE LAS <i>IPSCs</i> GENERADAS A TRAVÉS DEL ESTADÍO DE <i>MSCs</i></b>	<b>89</b>
7.1. Caracterización morfológica de las poblaciones de células similares a <i>MSCs</i>	89
7.2. Caracterización fenotípica de la población celular similar a <i>MSCs</i> obtenida	90
7.3. Diferenciación <i>in vitro</i> del conjunto celular similar a <i>MSCs</i> obtenido	91
7.3.1. Diferenciación adipogénica	91
7.3.2. Diferenciación osteogénica	91
7.3.3. Diferenciación condrogénica	93
<b>V. RESULTADOS DEL OBJETIVO 2</b>	<b>97</b>
<b>1. COMPROBACIÓN DE LA PRESENCIA DEL MARCADOR DE PLURIPOTENCIA <i>Oct4</i></b>	<b>98</b>
<b>2. IMPRESIÓN TRIDIMENSIONAL DE LA LÍNEA CELULAR A2B</b>	<b>98</b>
<b>3. ESTUDIO DE LA VIABILIDAD CELULAR EN LOS CONSTRUCTOS 3D CULTIVADOS <i>IN VITRO</i></b>	<b>99</b>
<b>4. EVALUACIÓN DE LA DIFERENCIACIÓN CONDRÓGENICA <i>IN VITRO</i> DE LOS CONSTRUCTOS 3D</b>	<b>100</b>
4.1. Evaluación macroscópica	100
4.2. Evaluación histológica	100
4.3. Evaluación molecular	102
<b>VI. DISCUSIÓN</b>	<b>103</b>
<b>VII. CONCLUSIONES</b>	<b>125</b>
<b>VIII. BIBLIOGRAFÍA</b>	<b>129</b>
<b>IV. ANEXOS</b>	<b>147</b>



## LISTADO DE ABREVIATURAS

<b>AA-vG:</b>	azul-alción van gieson
<b>Abs:</b>	absorbancias
<b>ACR:</b>	<i>american college of rheumatology</i> , colegio americano de reumatología
<b>ADN:</b>	ácido desoxiribonucleico
<b>ADNc:</b>	ácido desoxiribonucleico complementario
<b>AFP:</b>	alfa-fetoproteína
<b>ALDH1A2:</b>	<i>aldehyde dehydrogenase 1 family member A2</i> , miembro A2 de la familia aldehído deshidrogenasa 1
<b>AGG:</b>	<i>aggrecan</i> , agracano
<b>ARN:</b>	ácido ribonucleico
<b>ARNm:</b>	ácido ribonucleico mensajero
<b>ASCs:</b>	<i>adult stem cells</i> , células madre adultas
<b>ASH:</b>	albúmina sérica humana
<b>A2BP1:</b>	<i>ataxin 2-binding protein 1</i> , proteína 1 de unión a ataxina 2
<b>bFGF:</b>	<i>basic fibroblast growth factor</i> , factor de crecimiento fibroblástico
<b>BMPs:</b>	<i>bone morphonegic proteis</i> , proteínas morfogénicas de hueso
<b>BNLC:</b>	banco nacional de líneas celulares
<b>BSA:</b>	<i>bovine serum albumin</i> , albúmina sérica bovina
<b>B2M:</b>	<i>beta-2-microglobulin</i> , microglobulina beta 2
<b>CaCl<sub>2</sub>:</b>	cloruro de calcio
<b>c-Myc:</b>	<i>avian myelocytomatosis viral oncogene homolog c</i> , homólogo c del oncogen viral de la mielocitomatosis aviar
<b>CO<sub>2</sub>:</b>	dióxido de carbono

<b>Col:</b>	colágeno
<b>Col-I:</b>	colágeno de tipo I
<b>Col-II:</b>	colágeno de tipo II
<b>COL-2:</b>	colágeno de tipo II (gen)
<b>Col-IV:</b>	colágeno de tipo IV
<b>Col-IX:</b>	colágeno de tipo IX
<b>Col-X:</b>	colágeno de tipo X
<b>Col-XI:</b>	colágeno de tipo XI
<b>CREBB:</b>	<i>CREB binding protein</i> , proteína de unión a <i>CREB</i>
<b>DAPI:</b>	<i>4',6-diamidino-2-phenylindole</i> , 4',6-diamino-2-fenilindol
<b>DEF-CST<sup>TM</sup>:</b>	<i>Defined Culture System<sup>TM</sup></i>
<b>DMEM:</b>	<i>dulbecco's modified eagle's medium</i> , medio de águila modificado dulbecco
<b>DMSO:</b>	dimetilsulfósido
<b>dNTPs:</b>	<i>deoxynucleotide triphosphate</i> , desoxinucleósidos trifosfato
<b>EBs:</b>	<i>embryoid bodies</i> , cuerpos embrionarios
<b>EDTA:</b>	<i>ethylene diamine tetraacetic acid</i> , ácido etilen diamino tetracético
<b>ESCs:</b>	<i>embryonic stem cells</i> , células madre embrionarias
<b>EE.UU:</b>	Estados Unidos
<b>FACS:</b>	<i>fluorescence activated cell sorting</i> , separador celular activado por fluorescencia
<b>Fgfr4:</b>	<i>acidic fibroblast growth factor receptor</i> , receptor 4 del factor de crecimiento ácido fibroblástico
<b>FGFs:</b>	<i>fibroblast growth factors</i> , factores de crecimiento fibroblástico
<b>FITC:</b>	<i>fluorescein isocitiate</i> , isotiocianato de fluoresceína
<b>GAGs:</b>	glicosaminoglicanos



<b>GAPDH:</b>	<i>glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase</i> , gliceroaldehído 3-fosfato-deshidrogenasa
<b>GDF5:</b>	<i>growth differentiation factor 5</i> , factor 5 de diferenciación de crecimiento
<b>GUSB:</b>	<i>glucuronidase-β</i> , glucuronidasa- β
<b>GWAS:</b>	<i>genome wide association studies</i> , estudios de asociación de genoma completo
<b>Gy:</b>	grays
<b>h:</b>	horas
<b>HFF:</b>	<i>human foreskin fibroblasts</i> , fibroblastos de prepucio humano
<b>HE:</b>	hematoxilina-eosina
<b>HMBS:</b>	<i>hydroxymethylbilane synthase</i> , hidroximetilbilano sintasa
<b>Hz:</b>	hercios
<b>H<sub>2</sub>O:</b>	agua
<b>IDs:</b>	interfalángicas distales
<b>IGFs:</b>	<i>insulin-like growth factors</i> , factores de crecimiento similares a la insulina
<b>IL1-R1:</b>	<i>Interleukin 1 Receptor 1</i> , receptor 1 de interleukina 1
<b>IL-4R:</b>	<i>Interleukin 4 Receptor</i> , receptor de interleukina 4
<b>INIBIC:</b>	Instituto de Investigación Biomédica de A Coruña
<b>IPs:</b>	interfalágicas proximales
<b>iPSCs:</b>	<i>induced pluripotent stem cells</i> , células madre pluripotentes inducidas
<b>ISCIII:</b>	Instituto de Salud Carlos III
<b>ITS:</b>	insulina-transferrina-ácido selénico
<b>Klf4:</b>	<i>Kruppel-like factor 4</i> , factor similar al factor Kruppel 4

<b>KOH:</b>	hidróxido de potasio
<b>M:</b>	molar
<b><i>MATN3:</i></b>	<i>matrilin 3, matrilin 3</i>
<b>MCF:</b>	metacarpofalá
<b>MEC:</b>	matriz extracelular
<b><i>MEF:</i></b>	<i>mouse embryonic fibroblasts</i> , fibroblastos embrionarios de ratón
<b><i>MEM-NEAA:</i></b>	<i>MEM-non essential aminoacids</i> , aminoácidos no esenciales MEM
<b>min:</b>	minuto
<b>ml:</b>	mililitro
<b>mM:</b>	milimolar
<b><i>MMP:</i></b>	<i>matrix metalloproteinase</i> , metaloproteasas de matriz
<b><i>MMP8:</i></b>	<i>matrix metalloproteinase 8</i> , metaloproteasa de matriz 8
<b><i>MSCs:</i></b>	<i>mesenchymal stromal cells</i> , células mesenquimales estromales
<b>mV:</b>	milivoltios
<b><i>Myod:</i></b>	<i>myogenic differentiation gene 1</i> , gen de diferenciación miogénica 1
<b><i>NANOG:</i></b>	<i>nanog homeobox, homeobox nanog</i>
<b><i>NFC:</i></b>	<i>nanofibrilated cellulose</i> , celulosa nanofibrilada
<b><i>NF-κB:</i></b>	<i>nuclear factor kappa B</i> , factor nuclear kappa B
<b>NRE:</b>	niveles relativos de expresión
<b><i>OA:</i></b>	<i>osteoarthritis</i> , artrosis
<b><i>OAm:</i></b>	<i>hand osteoarthritis</i> , artrosis de manos
<b><i>Oct4:</i></b>	<i>octamer-binding transcription factor 4</i> , factor de transcripción 4 de unión a octámero
<b><i>OSKM:</i></b>	factores de reprogramación de Yamanaka
<b><i>PBS:</i></b>	<i>phosphate buffered saline</i> , solución salina tamponada con fosfato

<b>PCR:</b>	<i>polymerase chain reaction</i> , reacción en cadena de la polimerasa
<b>PE:</b>	<i>phycoerythrin</i> , ficoeritrina
<b>P/E:</b>	penicilina/estreptomicina
<b>PGs:</b>	proteoglicanos
<b>PI:</b>	<i>propidium iodide</i> , yoduro de propidio
<b>PSCs:</b>	<i>pluripotent stem cells</i> , células madre pluripotentes
<b>qRT-PCR:</b>	<i>quantitative Real Time PCR</i> , PCR cuantitativa en tiempo real
<b>REX1:</b>	<i>RNA exonuclease 1 homolog</i> , homólogo 1 de la exonucleasa de ARN
<b>Rock:</b>	<i>Rho-associated protein kinase</i> , proteinna quinada asociada a Rho.
<b>RPLP0:</b>	<i>Ribosomal protein, large, P0</i> , proteína ribosomal grande P0
<b>RPLP13:</b>	<i>Ribosomal protein, large, P13</i> , proteína ribosomal grande P13
<b>r.p.m:</b>	revoluciones por minuto
<b>RRNA18S:</b>	<i>18S ribosomal RNA</i> , ARN ribosomal 18S
<b>s:</b>	segundo
<b>SBF:</b>	suero bovino fetal
<b>SMA:</b>	<i>alpha smooth muscle actin</i> , alfa-actina del músculo liso
<b>SMAD3:</b>	<i>SMAD family member 3</i> , miembro 3 de la familia SMAD
<b>SNPs:</b>	<i>single nucleotide polymorphisms</i> , polimorfismos de un solo nucleótido
<b>SNT:</b>	<i>somatic nuclear transfer</i> , transferencia somática nuclear
<b>SO:</b>	safranina O
<b>Sox2:</b>	<i>sex determining region Y-box 2</i> , región determinante del sexo Y caja 2
<b>SOX9:</b>	<i>sex determining region Y-box 9</i> , región determinante del sexo Y caja 9
<b>SSEA-3:</b>	<i>stage specific embryonic antigen-3</i> , antígeno específico embrionario 3

<b><i>SSEA-4:</i></b>	<i>stage specific embryonic antigen-4</i> , antígeno específico embrionario 4
<b><i>STRs:</i></b>	<i>short tandem repeats</i> , secuencias microsatélites
<b><i>SV:</i></b>	<i>Sendai virus</i> , virus Sendai
<b><i>TBP:</i></b>	<i>TATA box binding protein</i> , proteína de unión a TATA
<b><i>TGFs:</i></b>	<i>transforming growing factors</i> , factores de crecimiento transformante
<b><i>TGF-β1:</i></b>	<i>transforming growth factor beta 1</i> , factor de crecimiento transformante beta 1
<b><i>TGF-β3:</i></b>	<i>transforming growth factor beta 3</i> , factor de crecimiento transformante beta 3
<b><i>TM:</i></b>	tricrómico de Masson
<b><i>TNF-alpha:</i></b>	<i>tumor necrosis factor alpha</i> , factor de necrosis tumoral alfa
<b><i>TUJ1:</i></b>	beta-tubulina III
<b><i>Vim:</i></b>	vimentina
<b><i>YWHAZ:</i></b>	<i>Tyrosine 3-monooxygenase/tryptophan 5-monooxygenase activation protein, zeta polypeptide</i>
<b>3D :</b>	tridimensional
<b>µg :</b>	microgramo
<b>µl :</b>	microlitro
<b>µm:</b>	micrómetro
<b>µM:</b>	micromolar
<b>°C:</b>	grado centígrado
<b>°:</b>	grados

## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Articulación sinovial y detalle de la histología del cartílago articular. Escala 100 µm. Imagen obtenida y adaptada de: <a href="https://www.mediespana.com/salud/diagnostico-tratamiento/dolor-rodilla/">https://www.mediespana.com/salud/diagnostico-tratamiento/dolor-rodilla/</a> .....	1
<b>Figura 2.</b> Componentes que forman la matriz extracelular del cartílago. Imagen obtenida y adaptada de: <a href="http://www.traumatologiaveterinaria.com/articulaciones/docs/cartilago_articular.pdf">http://www.traumatologiaveterinaria.com/articulaciones/docs/cartilago_articular.pdf</a> .....	3
<b>Figura 3.</b> Representación esquemática de las capas del cartílago articular. Imagen obtenida y adaptada de: <a href="https://link.springer.com/chapter/10.1007/978-3-319-44785-8_1">https://link.springer.com/chapter/10.1007/978-3-319-44785-8_1</a> .....	4
<b>Figura 4.</b> Articulaciones de la mano. Imagen obtenida y adaptada de Marshall <i>et al.</i> , 2018 (23)	8
<b>Figura 5.</b> Nódulos de Heberden y nódulos de Bouchard. Imagen obtenida y adaptada de: <a href="https://inforeuma.com/wp-content/uploads/2017/04/54_Artrosis-de-Mano_ENFERMEDADES-A4-v05.pdf">https://inforeuma.com/wp-content/uploads/2017/04/54_Artrosis-de-Mano_ENFERMEDADES-A4-v05.pdf</a> .....	9
<b>Figura 6.</b> Estadíos de diferenciación celular y potencial de diferenciación durante las distintas etapas del desarrollo. Imagen obtenida y adaptado de Hochedlinger y Jaenisch, 2002 (39). .....	11
<b>Figura 7.</b> Plasticidad de la diferenciación celular en el paisaje epigenético de Waddington. Imagen obtenida y adaptada de: <a href="https://www.ptglab.com/news/blog/cell-fate-commitment-and-the-waddington-landscape-model/">https://www.ptglab.com/news/blog/cell-fate-commitment-and-the-waddington-landscape-model/</a> .....	13
<b>Figura 8.</b> Representación esquemática de la seguridad de los distintos métodos de reprogramación. Imagen obtenida y adaptada de: <a href="http://assets.thermofisher.com/TFS-Assets/LSG/brochures/pluripotent-stem-cell-guidebook.pdf">http://assets.thermofisher.com/TFS-Assets/LSG/brochures/pluripotent-stem-cell-guidebook.pdf</a> .....	16
<b>Figura 9.</b> Obtención de fibroblastos dermales mediante la técnica de cultivo por explantes de las biopsias de piel de 3 mm de diámetro obtenidas de las tres donantes. Escala 100 µm.	34
<b>Figura 10.</b> Esquema general del proceso desarrollado para realizar la reprogramación de los fibroblastos dermales obtenidos de las tres donantes. ....	38
<b>Figura 11. (A)</b> Esquema de formación de cuerpos embrionarios ( <i>EBs</i> ) mediante el protocolo de diferenciación de gota colgante. <b>(B)</b> Flujo de trabajo desarrollado para estudiar la capacidad de diferenciación de las <i>iPSCs</i> hacia los linajes embrionarios. ....	47
<b>Figura 12.</b> Esquema general en el que se representa el proceso de caracterización de las células similares a <i>MSCs</i> obtenidas a partir de las líneas de <i>iPSCs</i> NFiPS 15/637#7 y MOAFiPS 15/645#7. ....	53
<b>Figura 13.</b> Representación esquemática del proceso desarrollado para preparar la mezcla de células <i>iPSCs</i> y la biotinta para llevar a cabo la impresión 3D. ....	63
<b>Figura 14.</b> Representación esquemática del proceso de impresión 3D realizado. ....	64
<b>Figura 15.</b> Esquema en el que se representa el flujo de trabajo para llevar a cabo los experimentos de análisis de viabilidad celular y recuento celular durante el proceso de cultivo de los constructos 3D y su diferenciación condrogénica.....	66
<b>Figura 16.</b> Caracterización de fibroblastos dermales humanos. (A) Cultivo de fibroblastos obtenido mediante la técnica de cultivo por explantes a partir de biopsias de piel de la	

paciente OA 1. Escala 100  $\mu\text{m}$ . (B) Detalle del cultivo de fibroblastos. Escala 50  $\mu\text{m}$ . (C) Imágenes de la tinción hematoxilina-eosina (HE) y de las tinciones inmunohistoquímicas para colágeno de tipo I (Col-1), receptor de crecimiento fibroblástico 4 (*Fgfr4*) y vimentina (Vim) realizadas como parte del proceso de caracterización de los cultivos de fibroblastos dermales de la donante sana, la paciente OA 1 y la paciente OA 2. Escala 50  $\mu\text{m}$ . ..... 73

**Figura 17.** Gráficos de citometría de flujo para el estudio del ciclo celular tras irradiación a 70 y 100 Gy. En el eje X, FL3-H representa la fluorescencia relativa en el canal de emisión del yoduro de propidio; en el eje Y, se observa el conteo de células (*counts*). (A) Dosis de 70 Gy. En negro, se representa la curva correspondiente a los fibroblastos de prepucio humanos (Fib) sin irradiar; la curva roja corresponde a las células irradiadas (Irr Fib). G1: Intervalo 1 del ciclo celular; S: fase de síntesis; G2: Intervalo 2; M: mitosis. (B) Dosis de 100 Gy. En violeta, se representa la curva correspondiente a los fibroblastos de prepucio humanos (HFF, Fib) sin irradiar; la curva verde corresponde a las células irradiadas (IRR HFF, Irr Fib). G1: Intervalo 1 del ciclo celular; S: fase de síntesis; G2: Intervalo 2; M: mitosis. .... 74

**Figura 18.** Gráfico de citometría de flujo para el estudio del ciclo celular tras irradiación a 75 Gy. En el eje X, FL3-H representa la fluorescencia relativa en el canal de emisión del yoduro de propidio; en el eje Y, se observa el conteo de células (*counts*). En violeta, se representa la curva correspondiente a los fibroblastos de prepucio humanos (Fib) sin irradiar; la curva verde corresponde a las células irradiadas (Irr Fib). G1: Intervalo 1 del ciclo celular; S: fase de síntesis; G2: Intervalo 2; M: mitosis. .... 75

**Figura 19.** Reprogramación no integrativa de fibroblastos dermales. (A) Cultivo de fibroblastos dermales antes de llevar a cabo el proceso de reprogramación celular. Escala 200  $\mu\text{m}$ . (B) Cultivo de fibroblastos 24 h después de la reprogramación y detalle del mismo. Escala 200  $\mu\text{m}$  y 50  $\mu\text{m}$  respectivamente. (C) Colonia de células detectada en cultivo 1 semana después de la reprogramación. Escala 200  $\mu\text{m}$ . (D) Colonia de células 22 días después de haber realizado el proceso de reprogramación celular y detalle de la misma. La punta de flecha señala los nucléolos prominentes. Escala 200  $\mu\text{m}$  y 50  $\mu\text{m}$  respectivamente. .... 76

**Figura 20.** Cultivo de *iPSCs* en Matrigel® + medio condicionado de células *MEF*. Derecha: imagen tomada con estereomicroscopio SMZ-745T de las colonias de *iPSCs* (clon #H) en sistema libre de *feeders*. Izquierda: imagen tomada con microscopio invertido mostrando en detalle una de las colonias. Escala: 100  $\mu\text{m}$  y 50  $\mu\text{m}$ , respectivamente. .... 77

**Figura 21.** (A) Imágenes tomadas en microscopio invertido de las células *iPSCs* tras el primer pase al sistema libre de *feeders* en medio de cultivo Essential 8 suplementado con Revitalcell™. Escala 100  $\mu\text{m}$  (B) Imágenes tomadas con estereomicroscopio SMZ-475T, de las colonias de *iPSCs* en sistema de cultivo libre de *feeders* utilizando Matrigel® y medio de cultivo Essential 8. Escala 100  $\mu\text{m}$ . .... 78

**Figura 22.** Cultivo de *iPSCs* en sistema DEF-CS™. (A) Imágenes tomadas con estereomicroscopio SMZ-475T de las colonias de *iPSCs* cultivadas con el kit DEF-CS™, y detalle de las mismas en microscopio invertido. Escala: 100  $\mu\text{m}$ . (B) Imágenes tomadas con microscopio invertido de células *iPSCs* creciendo en monocapa en sistema de cultivo DEF-CS™. Escala: 100  $\mu\text{m}$ . .... 79

**Figura 23.** Cultivo de *iPSCs* en laminina-521 y medio de cultivo StemFlex. (A) Imágenes tomadas con microscopio invertido de las colonias de *iPSCs* de cada donante. Escala: 100  $\mu\text{m}$ . (B) Imagen representativa de una de las colonias de *iPSCs* después del día del pase en medio StemFlex y matriz de laminina-521, mostrando detalle de los bordes menos redondeados. Escala: 100  $\mu\text{m}$  (imagen izquierda) y 50  $\mu\text{m}$  (imagen derecha). .... 80

- Figura 24.** Tinción para detectar actividad de la enzima fosfatasa alcalina en las colonias de *iPSCs* de cada donante en pase 0 y en las colonias de *iPSCs* de la donante sana clon #7 (NFiPS 15/637#7), la paciente OA 1 clon #7 (MOAFiPS 15/645#7) y la paciente OA 2 clon #17 (MOAFiPS 15/646#17) con más de 20 pases en cultivo sobre células *feeder*. Escala: 100 µm. .... 82
- Figura 25.** Análisis de expresión génica en los clones de *iPSCs*. (A) Niveles relativos de expresión (NRE) de los factores de reprogramación endógenos (*OCT4* ENDO, *SOX2* ENDO, *KLF4* ENDO, *CMYC* ENDO), los genes característicos de pluripotencia (*CRIPTO*, *NANOG*) y genes del virus Sendai (*CMYC*) de (A) los clones #E, #H, #2 y #7 de la donante sana, así como en los fibroblastos parentales antes de reprogramar; (B) los clones #7 y #4 de la paciente OA 1, así como en los fibroblastos parentales antes de reprogramar; y (C) los clones #9, #11, #12 y #17 de la paciente OA 2, así como en los fibroblastos parentales antes de reprogramar. .... 84
- Figura 26.** (A) Imágenes de inmunofluorescencia mostrando la presencia de los marcadores de pluripotencia *NANOG* (fluorescencia roja) y *TRA-1-81* (fluorescencia verde) en las colonias de *iPSCs* de la donante sana (NFiPS 15/637#7), la paciente OA 1 (MOAFiPS 15/645#7) y la paciente OA 2 (MOAFiPS 15/646#17). Las preparaciones aparecen contrateñidas con *DAPI*. Escala 100 µm. (B) Detalle de la localización nuclear de *NANOG* en una colonia representativa de *iPSCs*. Las preparaciones aparecen contrateñidas con *DAPI*. Escala 50 µm. (C) Detalle de la localización citoplasmática de *TRA-1-81* en una colonia representativa de *iPSCs*. Las preparaciones aparecen contrateñidas con *DAPI*. Escala 50 µm. .... 86
- Figura 27.** Imágenes de inmunofluorescencia que muestran la presencia del marcador de ecodermo (AFP, en rojo), el marcador de mesodermo (SMA, en verde) y el marcador de ectodermo (TUI1, en verde) en las *iPSCs* de las tres donantes (NFiPS 15/637#7, MOAFiPS 15/645#7 y MOAFiPS 15/646#17) transcurridos 21 días de diferenciación. Las preparaciones se contrateñieron con *DAPI*. Escala 100 µm. MOAFiPS 15/646#17, ectodermo, escala 50 µm. .... 87
- Figura 28.** Cariograma mostrando los resultados obtenidos tras el análisis de cariotipo mediante bandejo G, mostrando la dotación cromosómica diploide normal de las células (46, XX). 88
- Figura 29.** Poblaciones de células similares a células mesenquimales estromales (*MSCs*) generadas a partir de las líneas de *iPSCs*. (A) Población de células creciendo a partir de los cuerpos embrionarios durante el proceso de diferenciación de las líneas de *iPSCs* hacia células similares a células mesenquimales estromales (*MSCs*). Escala 100 µm (B) Población heterogénea de células obtenida tras el primer y el segundo pase de las líneas de *iPSCs* durante el proceso de diferenciación. Las flechas rojas señalan las células de morfología redondeada. Las flechas verdes señalan las células de morfología alargada. Escala 100 µm. (C) Población de *MSCs* primarias humanas en cultivo utilizada como referencia para el análisis de la morfología de las poblaciones celulares obtenidas. (D) Población homogénea de células similares a *MSCs* tras el tercer y octavo pase. Las flechas verdes señalan las prolongaciones citoplasmáticas características de las *MSCs*. Escala 100 µm. .... 90
- Figura 30.** Diferenciación adipogénica y osteogénica de las células similares a mesenquimales estromales (*MSCs*). (A) Análisis histológico de la diferenciación adipogénica y osteogénica de la línea de *iPSCs* NFiPS 15/637#7 estimuladas durante 21 días con medios de diferenciación específicos (adipogénesis y osteogénesis) y cultivadas durante 21 días en medio EB (control -). (B) Análisis histológico de la diferenciación adipogénica y osteogénica de la línea de *iPSCs* MOAFiPS 15/645#7 estimuladas durante 21 días con medios de diferenciación específicos (adipogénesis y osteogénesis) y cultivadas durante 21 días en medio EB (control -). .... 92

- Figura 31.** Cuantificación de la diferenciación adipogénica y osteogénica. (A) Gráfico de barras que representa el porcentaje de área teñida positivamente para la tinción *Oil-Red-O* en las células estimuladas y en las células control (control -) de las líneas de *iPSCs* NFiPS 15/637#7 y MOAFiPS 15/6457. (B) Gráfico de barras que representa el porcentaje de área teñida positivamente para la tinción Rojo Alizarina en las células estimuladas y en las células control (control -) de las líneas de *iPSCs* NFiPS 15/637#7 y MOAFiPS 15/6457. Los datos se representan como media  $\pm$  desviación estándar..... 93
- Figura 32.** Análisis histológico de la diferenciación condrogénica en micromasas de la línea de *iPSCs* NFiPS 15/637#7. Tinción hematoxilina-eosina (HE), tricrómico de Masson (TM) y safranina O (SO). Las flechas rojas señalan las fibras de Col de la matriz extracelular en color azul. Las flechas negras señalan la tonalidad naranja que adquieren los PGs de la MEC..... 94
- Figura 33.** Análisis histológico de la diferenciación condrogénica en micromasas de la línea de *iPSCs* MOAFiPS 15/645#7. Tinción hematoxilina-eosina (HE), tricrómico de Masson (TM) y safranina O (SO). La flecha roja señala las fibras de Col de la MEC en color azul. .... 95
- Figura 34.** Imágenes de inmunofluorescencia de una colonia de células de la línea de *iPSCs* A2B mostrando la presencia del marcador de pluripotencia *Oct4*. Las preparaciones fueron contrateñidas con *DAPI*. *Oct4* presentó localización nuclear, coincidiendo con la localización de *DAPI* (*Merge*). Escala 400  $\mu$ m. .... 98
- Figura 35.** Constructos 3D tras la bioimpresión de las células A2B. (A) Imagen en la que se muestra la placa de 96 pocillos con los constructos compuestos por células y biotinta tras la impresión 3D de las células A2B. (B) Detalle de uno de los constructos. (C) Imagen tomada con microscopio invertido en el que se observa uno de los constructos 3D impresos. Escala 5  $\mu$ m. .... 99
- Figura 36.** Análisis de la viabilidad y la proliferación de las células A2B tras el proceso de impresión 3D. (A) Gráfico en el que representa la viabilidad celular a lo largo del tiempo en el interior de los constructos tras la impresión 3D de las células A2B. (B) Gráfico en el que se representa el número total de células en el interior de los constructos 3D a lo largo del tiempo ..... 99
- Figura 37.** Observación macroscópica y análisis histológico de los constructos 3D tras seis semanas de diferenciación en medio condrogénico. (A) Constructo obtenido tras la impresión 3D de las *iPSCs* en la biotinta de nanocelulosa, laminina y alginato. (B) Imágenes de la tinción AA-vG en los constructos 3D. Las flechas negras señalan las células de morfología redondeada alojadas en cavidades de la MEC. Imágenes superiores, escala 250  $\mu$ m. Imágenes 1,2,3,4 y 5 detalle de la tinción; escala 100  $\mu$ m. .... 101
- Figura 38.** Análisis molecular de la diferenciación condrogénica de los constructos 3D. Gráficos de barras en los que se representan los niveles relativos de expresión (NRE) de los genes *OCT4*, *SOX9* y *COL-2* en las células en el interior de los constructos 3D antes (tiempo 0) y después de 6 semanas de diferenciación en medio condrogénico (6 Semanas). .... 102



## ÍNDICE DE TABLAS

<b>Tabla I.</b> Factores de riesgo establecidos para el desarrollo de artrosis. ....	6
<b>Tabla II.</b> Resumen de los estudios realizados en ingeniería tisular del cartílago utilizando <i>iPSCs</i> . .....	24
<b>Tabla III.</b> Secuencias y características de los cebadores empleados en la <i>qRT-PCR</i> para la amplificación de genes específicos de células pluripotentes, de los factores de reprogramación endógenos y del virus Sendai ( <i>SV</i> ). ....	44
<b>Tabla IV.</b> Secuencias y características de los cebadores empleados para evaluar la presencia de los <i>SNPs</i> seleccionados. ....	50
<b>Tabla V.</b> Tabla resumen en la que se recogen los medios de cultivo empleados en las distintas etapas de desarrollo del objetivo 2, cuándo se utilizaron y la composición de los mismos. .....	65
<b>Tabla VI.</b> Niveles relativos de expresión (NRE) de los factores de reprogramación endógenos ( <i>OCT4</i> ENDO, <i>SOX2</i> ENDO, <i>KLF4</i> ENDO, <i>CMYC</i> ENDO), los genes característicos de pluripotencia ( <i>CRIPTO</i> , <i>NANOG</i> ) y genes del <i>SV</i> ( <i>CMYC</i> virus, <i>VIRUS SENDAI</i> ) en los clones de <i>iPSCs</i> de cada donante y en los fibroblastos dermales parentales antes de realizar el proceso de reprogramación. ....	83
<b>Tabla VII.</b> Resultados tras el análisis de <i>STRs</i> de los fibroblastos dermales parentales y las líneas generadas de <i>iPSCs</i> , confirmando el origen de las mismas. ....	88
<b>Tabla VIII.</b> Tabla resumen de las líneas de <i>iPSCs</i> generadas y características de cada una de ellas. ....	88
<b>Tabla IX.</b> Resultados obtenidos tras el estudio de polimorfismos de un solo nucleótido en los genes <i>A2BPI</i> , <i>ALDH1A2</i> , <i>GDF5</i> , <i>TNF-alpha</i> , <i>SMAD3</i> , <i>IL-4R</i> , <i>IL1-R1</i> , <i>MMP8</i> y <i>MATN3</i> mediante secuenciación Sanger. ....	89
<b>Tabla X.</b> Porcentajes de positividad para los marcadores característicos de células mesenquimales estromales ( <i>MSCs</i> ) en las células similares a <i>MSCs</i> derivadas de las líneas de <i>iPSCs</i> NFIPS 15/637#7 y MOAFIPS 15/645#7. ....	91



## **RESUMEN**



## RESUMEN

La artrosis es la patología articular de mayor prevalencia y una causa importante del deterioro de la calidad de vida. Sin embargo, no existen tratamientos efectivos ni fármacos que promuevan la reparación de lesiones en el cartílago articular. El descubrimiento de las células madre pluripotentes inducidas o *iPSCs* ha proporcionado una fuente celular con gran potencial en Biomedicina ya que sus propiedades las convierten en una herramienta prometedora para el modelado de enfermedades y aplicaciones de medicina regenerativa e ingeniería tisular.

Los objetivos de este trabajo fueron, en primer lugar, generar y caracterizar *iPSCs* a partir de fibroblastos de pacientes con artrosis de manos, con el fin de establecer modelos celulares de la enfermedad. En segundo lugar, dentro de un enfoque de la ingeniería tisular, se buscó profundizar en la diferenciación condrogénica de las *iPSCs* con el fin de generar *in vitro* un tejido similar al cartílago articular utilizando técnicas de impresión 3D.

Los resultados obtenidos mostraron la generación exitosa de dos líneas de *iPSCs* de pacientes con artrosis y una línea de donante sana, que presentaron distinta capacidad de diferenciación hacia el linaje condrogénico y, por ello, podrían ser utilizadas como herramienta para profundizar en el conocimiento de las bases celulares y moleculares que conducen al desarrollo de artrosis. Se demostró además que las células *iPSCs* pueden someterse a impresión 3D y diferenciarse condrogénicamente para generar un tejido similar al cartílago articular.



## RESUMO

A artrose é a patoloxía articular de maior prevalencia e unha causa importante do deterioro da calidade de vida. Con todo, non existen tratamentos efectivos nin fármacos que promovan a reparación de lesións na cartilaxe articular. O descubrimento das células nai pluripotentes inducidas ou *iPSCs* proporcionou unha fonte celular con gran potencial en Biomedicina xa que as súas propiedades convértenas nunha ferramenta prometedora para o modelado de enfermidades e aplicacións de medicina rexenerativa e enxeñería tisular.

Os obxectivos deste traballo foron, en primeiro lugar, xerar e caracterizar *iPSCs* a partir de fibroblastos de pacientes con artrose de mans, co fin de establecer modelos celulares da enfermidade. En segundo lugar, dentro dun enfoque da enxeñería tisular, buscouse profundizar na diferenciación condroxénica das *iPSCs* co fin de xerar *in vitro* un tecido similar á cartilaxe articular utilizando técnicas de impresión 3D.

Os resultados obtidos mostraron a xeración exitosa de dúas liñas de *iPSCs* de pacientes artrósicos e unha liña de doante san, as cales presentaron distinta capacidade de diferenciación cara á liñaxe condroxénica e, por iso, poderían ser utilizadas como ferramenta para profundizar no coñecemento das bases celulares e moleculares que conducen ao desenvolvemento de artrose. Demostrouse ademais que as células *iPSCs* poden someterse a impresión 3D e diferenciarse condroxénicamente para xerar un tecido similar á cartilaxe articular.





## ABSTRACT

Osteoarthritis is the most prevalent joint disease and the main cause of quality life deterioration. However, there are no effective drugs or treatments promoting the restoration of articular cartilage injuries. The discovery of induced pluripotent stem cells or iPSCs has enabled researches with a promising cell source for developing biomedical studies. Due to its intrinsic properties, iPSCs represent an invaluable tool for disease modelling, regenerative medicine and tissue engineering applications.

The aim of this research has been, firstly, to generate and characterize iPSCs obtained from patients with hand osteoarthritis, in order to establish cellular models of the disease. Secondly, more focused on tissue engineering approaches, we sought to deeply study iPSCs chondrogenic differentiation aiming to generate cartilage-like tissue *in vitro* by using 3D printing techniques.

Results obtained shown the successful generation of two iPSC-lines from patients with osteoarthritis and one iPSC-line from a healthy donor. These cell lines presented different chondrogenic capacities and therefore, they could be used as a tool to improve our knowledge regarding the molecular and cellular mechanisms causing osteoarthritis development. Moreover, we shown that *iPSCs* are able to chondrogenically differentiate after 3D bioprinting to generate cartilage-like tissue *in vitro*.



# **I. INTRODUCCIÓN**



## 1. EL CARTÍLAGO ARTICULAR

El cartílago articular humano es un tejido conjuntivo altamente especializado, aneural, avascular y alinfático, que reviste las superficies óseas articulares de las articulaciones sinoviales. Ofrece una superficie de apoyo resistente, lisa y lubricada para un deslizamiento sin fricción entre las superficies articulares (1), además de facilitar la absorción y transmisión de cargas al hueso subcondral subyacente (2). Presenta un aspecto blanquecino brillante y su grosor oscila entre 2 y 3 mm (3).

### 1.1. Composición

En el ser humano, este tejido está formado por una matriz extracelular (MEC), responsable de las propiedades viscolásticas del cartílago, y por un reducido número de células denominadas condrocitos (1) (Figura 1).

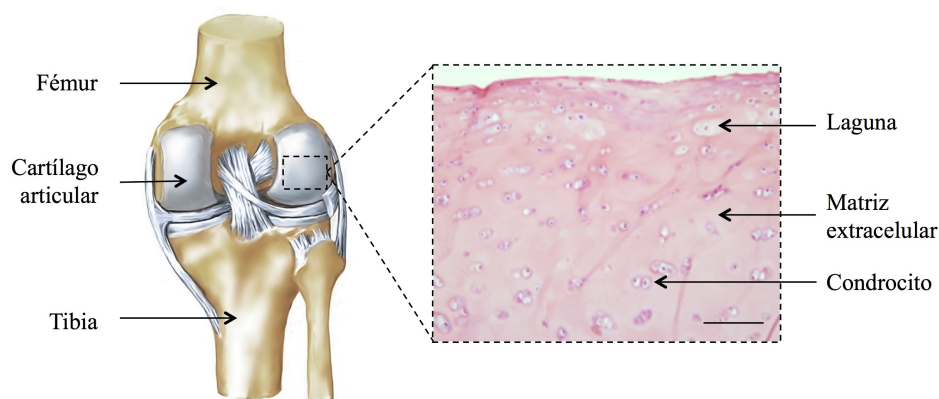


Figura 1. Articulación sinovial y detalle de la histología del cartílago articular. Escala 100  $\mu$ m. Imagen obtenida y adaptada de: <https://www.mediespana.com/salud/diagnostico-tratamiento/dolor-rodilla/>

#### 1.1.1. Condrocitos

Los condrocitos son los únicos elementos celulares del cartílago y representan menos del 1-2% del volumen total del mismo (3). Son células metabólicamente activas y altamente especializadas que desempeñan un papel único en el desarrollo, mantenimiento y reparación de la MEC. Además, son los encargados de producir una gran variedad de mediadores biológicos (4, 5).

Los condrocitos se originan a partir de células mesenquimales estromales (*mesenchymal stromal cells, MSCs*), presentan una baja actividad mitótica y se encuentran alojados en unas cavidades denominadas condromas, condrones o lagunas. Su forma, número y tamaño varían en función de la región anatómica del cartílago en la que se encuentren (6). Aunque inicialmente se creía que los condrocitos constituían unidades aisladas e

independientes y que la comunicación entre ellos sólo tenía lugar mediante difusión a través de los componentes de la MEC (7), recientemente se ha descubierto que los condrocitos también se comunican entre sí a través de contactos célula-célula (8).

### **1.1.2. Matriz extracelular**

La MEC está formada fundamentalmente por una red de fibras de colágeno (Col), proteoglicanos (PG) y agua (Figura 2). El agua representa entre el 70-80% del peso total del cartílago. El colágeno contribuye alrededor del 50% del peso seco, los PG constituyen el 30-35% y las proteínas no colágenas y las glicoproteínas el 15- 20% (3).

#### **1.1.2.a. Colágeno**

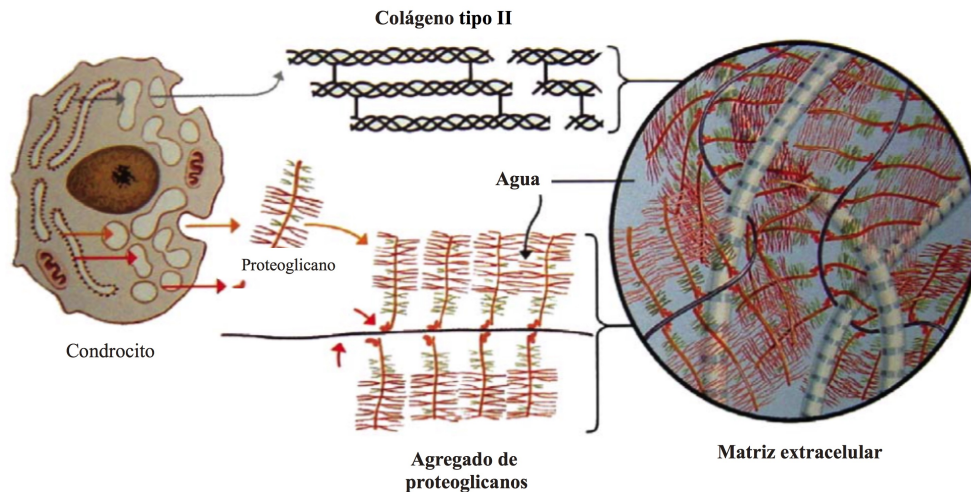
El mayor componente sólido del cartílago articular es el Col de tipo II (Col-II), que supone el 80-90% del total de colágeno (7). El Col-II se organiza como un entramado tridimensional especial a modo de malla, orientado para descargar las fuerzas de tracción y proporcionar así resistencia a la tensión (2).

En la MEC del cartílago articular existen además otros tipos de Col, aunque en menor porcentaje, como el Col de tipo VI (Col-VI), de tipo IX (Col-IX) y de tipo XI (Col-XI), que contribuyen la formación y estabilización de la red de Col-II; o el Col de tipo X (Col X), que está relacionado con la hipertrofia celular (9).

#### **1.1.2.b. Proteoglicanos**

Los PG son monómeros de proteínas altamente glicosiladas que representan el segundo gran grupo de macromoléculas de la MEC. El cartílago articular contiene una gran variedad de PG, todos ellos esenciales para el correcto funcionamiento de este tejido. El PG más abundante y de mayor tamaño es el agrecano (*aggrecan*, *AGG*), que está compuesto por una gran proteína central a la que se unen covalentemente cadenas de glicosaminoglicanos (GAGs), particularmente, condroitín sulfato y queratán sulfato. El *AGG* se caracteriza por su habilidad para interactuar con el ácido hialurónico para formar grandes agregados de PGs a través de proteínas de anclaje (6).

Las fibras de Col-II junto con los agregados de PG proporcionan soporte estructural a la MEC. Además, la carga negativa de algunos GAGs, como el condroitín y el queratán sulfato, confiere al cartílago su capacidad de absorción de agua y, con ello, su capacidad para resistir a la compresión (1, 10).



**Figura 2.** Componentes que forman la matriz extracelular del cartílago. Imagen obtenida y adaptada de: [http://www.traumatologiaveterinaria.com/articulaciones/docs/cartilago\\_articular.pdf](http://www.traumatologiaveterinaria.com/articulaciones/docs/cartilago_articular.pdf)

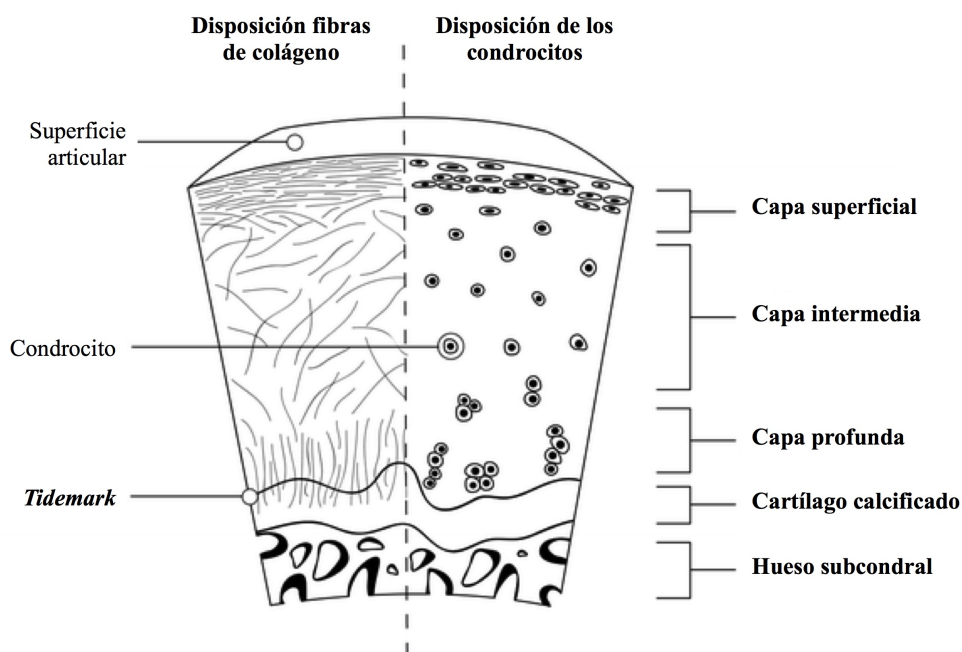
## 1.2. Estructura

Anatómicamente, el cartílago articular se divide en varias capas (Figura 3), que difieren en el número de células, la disposición de los componentes de la MEC y, consecuentemente, sus propiedades mecánicas (1-3, 6):

- Capa superficial o tangencial. Representa el 10-20% del volumen total del cartílago articular. Sus fibras de Col están fuertemente empaquetadas y se alinean paralelas a la superficie articular. Contiene un número relativamente elevado de condrocitos de pequeño tamaño y morfología aplanada y alargada. Se encuentra en contacto con el líquido sinovial y representa la capa con una mayor proporción de Col, mientras que la cantidad de PG es reducida en comparación con el resto de las capas.
- Capa intermedia u oblicua. Constituye el 40-60% del volumen total del cartílago articular. Sus fibras de Col son más gruesas y se encuentran dispuestas oblicuamente. En esta capa, se encuentra la mayor concentración de PG de la MEC. Los condrocitos, presentes en menor número y con una distribución aleatoria, tienen morfología esférica y son de mayor tamaño que en la capa superficial.
- Capa profunda o vertical. Representa el 30-40% del volumen total del cartílago articular. Contiene las fibras de Col de mayor diámetro, que están dispuestas perpendicularmente a la superficie articular. Los condrocitos presentan morfología esférica y se distribuyen en columnas de 2-6 células, paralelas a las fibras de Col.
- Capa de cartílago calcificado. Las fibras de Col, ancladas al hueso subcondral, se

disponen perpendicularmente a la superficie articular. Tiene un elevado contenido en PG. Los condrocitos son escasos, grandes e hipertróficos.

Además, existe una línea de calcificación o *tidemark*, que separa la capa profunda de la capa de cartílago calcificado (3, 4, 6).



**Figura 3.** Representación esquemática de las capas del cartílago articular. Imagen obtenida y adaptada de: [https://link.springer.com/chapter/10.1007/978-3-319-44785-8\\_1](https://link.springer.com/chapter/10.1007/978-3-319-44785-8_1)

### 1.3. Integridad del cartílago articular

Los condrocitos desempeñan un papel fundamental en el mantenimiento de la integridad de la MEC del cartílago, siendo los responsables de dirigir la síntesis, incorporación y degradación de las proteínas que la componen (3). Esta actividad metabólica de los condrocitos puede verse alterada por distintos factores dentro de su entorno químico y mecánico circundante, puesto que responden a una amplia variedad de estímulos, incluidos factores de crecimiento, cargas mecánicas y presiones hidrostáticas (2, 3).

En condiciones no patológicas, el equilibrio entre la síntesis y el catabolismo de los componentes de la MEC por los condrocitos asegura el mantenimiento y la renovación de la MEC. Cualquier alteración en la función de los condrocitos puede producir la ruptura de dicho equilibrio y favorecer así la degradación del cartílago (5).

Dado que el cartílago articular es un tejido avascular, alinfático y con una baja densidad celular, su capacidad de reparación es limitada (5, 11). Así, las lesiones y microlesiones que se originan por desequilibrios metabólicos o por daño o enfermedad desencadenan



una cascada de reacciones que desestabilizan la articulación, pudiendo conducir al desarrollo de enfermedades como la artrosis (*osteoarthritis*, *OA*) (1, 11, 12).

## **2. ARTROSIS**

La *OA* es un trastorno heterogéneo que afecta a las articulaciones móviles, caracterizado por la degradación de la MEC del cartílago y el estrés celular. Este trastorno es iniciado por micro- o macro- lesiones que activan respuestas inadaptadas de reparación, entre las que se encuentran las vías pro-inflamatorias de la inmunidad innata. La *OA* se manifiesta primero como una alteración molecular (alteración del metabolismo del tejido articular), seguida de alteraciones anatómicas y/o fisiológicas (caracterizadas por degradación del cartílago, remodelación ósea, formación de osteofitos, inflamación de las articulaciones y pérdida de la función normal de las articulaciones) que pueden culminar en la aparición de la dolencia (13).

Además de la degeneración del cartílago articular, la *OA* puede provocar cierto grado de inflamación sinovial (sinovitis) y alteraciones en los tejidos periarticulares y el hueso subcondral (4). Por ello, algunos autores consideran la articulación como un “órgano” y la *OA* como una respuesta activa al daño articular y a la pérdida de su función (14, 15).

### **2.1. Prevalencia y factores de riesgo**

La *OA* es la patología articular más prevalente y la causa más frecuente de discapacidad (4). Aunque puede cursar en todas las edades, su incidencia está relacionada con el envejecimiento: el 70% de los mayores de 65 años presenta algún grado de *OA* (16). En España, la *OA* afecta al 10% de la población mayor de 20 años y al 19,6% en la población mayor de 40 años (17).

Por otro lado, las diferencias sexo-específicas son evidentes. Antes de los 50 años, la prevalencia de la *OA* es mayor en los hombres que en las mujeres. Sin embargo, después de los 50 años, las mujeres se ven afectadas con mayor frecuencia que los hombres (18).

Existen distintos factores de riesgo establecidos para el desarrollo de *OA* (Tabla I), que pueden agruparse en (i) factores de riesgo modificables y (ii) factores de riesgo no modificables. Entre los factores de riesgo modificables destacan la obesidad, el tabaquismo, la dieta y diversos factores mecánicos; mientras que los factores de riesgo no modificables son genéticos, el sexo, la etnia y la edad (19).

---

Finalmente, cabe destacar que esta patología articular supone un problema para la sociedad, tanto en lo que se refiere a calidad de vida como en términos económicos (1). El estudio ArtRoCad de la Sociedad Española de Reumatología estimó que el coste económico de la *OA* en el año 2007 fue de 4.738 millones de euros, cifra que representa el 0,5% del producto nacional bruto (20).

**Tabla I.** Factores de riesgo establecidos para el desarrollo de artrosis.

Factores de riesgo no modificables	Factores de riesgo modificables
Genéticos (50% de los casos)	Obesidad
Sexo (predominio en mujeres)	Traumatismos previos
Etnia (mayor incidencia de artrosis de rodillas en mujeres afroamericanas)	Alteración de la alineación articular
Edad (a partir de los 45 años)	Actividad laboral
	Deportes de competición
	Fuerza debilitada en el cuádriceps
	Densidad mineral ósea elevada
	Menopausia
	Tabaquismo (sugerido como factor protector)
	Dieta

## 2.2. Manifestaciones clínicas

En lo que respecta a las manifestaciones clínicas, éstas suelen aparecer a partir de los 40 años con un inicio gradual y una evolución lenta, aunque con variaciones según el individuo y la localización de la patología. Los síntomas y signos de la enfermedad generalmente son dolor articular, limitación de los movimientos, crujidos y, ocasionalmente, grados variables de tumefacción o incluso derrame sinovial. Otros signos y síntomas son la deformidad y mala alineación articular, la inestabilidad y la rigidez (19).

La *OA* puede desarrollarse en cualquier articulación sinovial del cuerpo, aunque es más común en la cadera, la rodilla y las articulaciones de la mano (18, 21). No suele afectar a hombros, codos ni tobillos, salvo en casos de *OA* desencadenadas por traumatismos u otras enfermedades (19).

### 2.2.1. Artrosis de manos

La *OA* de manos (*OAm*) es uno de los tipos de *OA* más prevalentes y tiene un impacto considerable en la calidad de vida de los pacientes, al impedirles realizar actividades de la vida diaria. Se produce por un desgaste del cartílago de las articulaciones de la mano y suele producir dolor, rigidez, dificultad para mover los dedos y deformidad (22, 23).

En comparación con la *OA* de rodilla y cadera, la *OAm* parece ser un subtipo separado y sustancialmente diferente de *OA*, al menos en lo que respecta a factores genéticos, patogénesis y curso de la enfermedad. Se ha sugerido que el papel de la inflamación parece ser fundamental en el inicio y la progresión de dicha patología (21). Sin embargo, según otros autores, la inflamación podría ser una consecuencia de la progresión de la enfermedad en lugar de la causa de la misma (23).

La *OAm* puede definirse de varias maneras: (i) según los criterios clínicos del *American College of Rheumatology (ACR)*, (ii) según cambios estructurales detectados mediante técnicas de imagen (*OAm* radiográfica), o (iii) según cambios estructurales detectados mediante radiografía acompañados de síntomas como dolor o rigidez (*OAm* de sintomática) (23). En función de la definición utilizada, así como de otros factores tales como el sexo o el área geográfica de la población de estudio, la prevalencia estimada de esta patología puede variar (24). En España, según los datos del estudio EPISER desarrollado por la Sociedad Española de Reumatología, se estima que la prevalencia de la *OAm*, según los criterios del *ACR*, es de un 6,2% (17).

La edad es el principal factor de riesgo de desarrollar *OAm*. La incidencia de la afección aumenta después de los 45 años de edad y varía de un 5% a los 40 años hasta un 65% después de los 80 años. La sobrecarga mecánica es el principal factor predisponente para el desarrollo de *OAm*, pero también podrían estar asociados otros factores como el sexo, las hormonas, la genética o la obesidad (22, 23, 25).

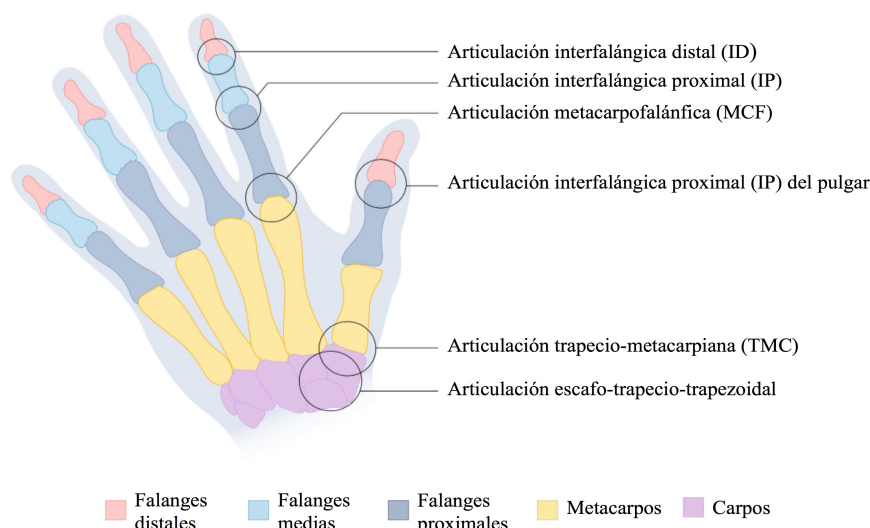
A pesar de la alta prevalencia y el grado de discapacidad provocado por esta enfermedad, todavía existe un gran desconocimiento sobre su patogénesis. La mayor parte de los trabajos de investigación sobre *OA* de los últimos años se han concentrado en la rodilla y la cadera, de modo que el conocimiento y los resultados de investigación sobre la *OAm* son escasos (22). Además, la baja disponibilidad de muestras, tanto “artrósicas” como control, y la ausencia de modelos animales que reúnan las características de esta patología hace todavía más complicado el estudio de esta enfermedad (23, 26).

#### **2.2.1.a. Tipos de artrosis de manos**

Las articulaciones de la mano que se ven afectadas con más frecuencia por esta patología son las articulaciones interfalángicas distales (IDs), interfalángicas proximales (IPs), metacarpofalángica (MCF) y trapecio-metacarpiana (TMC) (Figura 4).

---

Es frecuente que una misma persona tenga *OA* en varias de estas articulaciones (23).

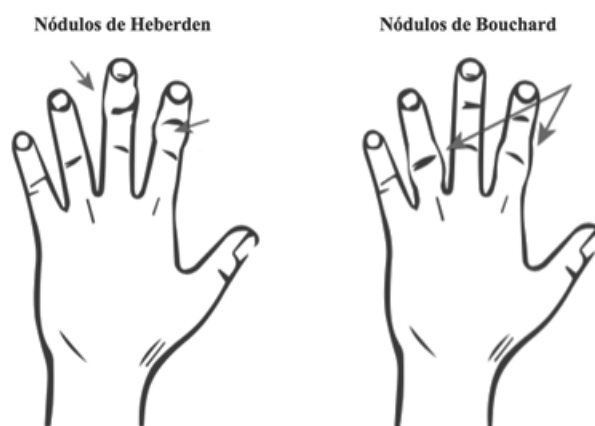


**Figura 4.** Articulaciones de la mano. Imagen obtenida y adaptada de Marshall *et al.*, 2018 (23)

Las articulaciones IDs son, normalmente, las articulaciones de los dedos más afectadas por la *OAm*. Se caracteriza por la formación de los denominados nódulos de Heberden (Figura 5), una deformación fruto de la formación de osteofitos y del engrosamiento de la cápsula y los ligamentos de las articulaciones IDs (23, 25). Existe, además, un subtipo de *OA* en los dedos denominada *OA* erosiva o inflamatoria, que cursa con una evolución más severa que la forma clásica de *OA*, episodios agudos de inflamación y graves deformidades (23, 27). Estos síntomas pueden afectar progresivamente a las articulaciones IPs (25).

La *OA* en las articulaciones IPs suele aparecer asociada a la anterior en el 30% de los casos, aunque esta localización es menos frecuente y también suele ocurrir en mujeres de mediana edad. En este caso, también aparecen deformaciones en las articulaciones afectadas denominadas nódulos de Bouchard (Figura 5). En comparación con la *OA* de las articulaciones IDs, ésta es menos incapacitante y suele respetar el rango de movimiento de las articulaciones (25).

Cabe destacar que algunos autores agrupan la *OA* de las articulaciones IDs y las articulaciones IPs bajo el nombre de *OAm* nodal, debido a la formación de los nódulos de Heberden y de Bouchard (23).



**Figura 5.** Nódulos de Heberden y nódulos de Bouchard. Imagen obtenida y adaptada de: [https://inforeuma.com/wp-content/uploads/2017/04/54\\_Artrosis-de-Mano\\_ENFERMEDADES-A4-v05.pdf](https://inforeuma.com/wp-content/uploads/2017/04/54_Artrosis-de-Mano_ENFERMEDADES-A4-v05.pdf)

La *OA* en las articulaciones MCF, también denominada *OA* de Missouri, fue descrita por primera vez en 1987 (28), es poco frecuente y suele asociarse al desarrollo de trabajos manuales durante largos períodos de tiempo. Los cambios radiográficos característicos suelen ser la pérdida de espacio articular, los osteofitos prominentes y las cabezas metacarpianas quísticas más prominentes en la segunda y tercera articulación MCF (29).

La *OAm* en la articulación TMC, también conocida como rizartrrosis o *OA* de pulgar, es la localización más común en mujeres mayores de 55 años y suele afectar de manera más severa a la mano dominante. El dolor mecánico en la base del pulgar y en la eminencia tenar es el principal signo clínico de la patología (23, 25).

#### **2.2.1.b. Componente genético en la artrosis de manos**

A pesar de la naturaleza multifactorial de la *OAm*, el componente genético involucrado en su desarrollo es muy importante y puede predisponer a una persona a padecer la enfermedad, especialmente en mujeres (25).

En 1941, Stecher y colaboradores documentaron por primera vez el papel de los factores genéticos en la susceptibilidad a padecer *OAm*. Estos autores observaron que los nódulos de Heberden eran tres veces más comunes en las hermanas de los 64 sujetos afectados que en la población general (30). Estos datos han sido posteriormente respaldados por otros estudios, sugiriendo que la *OAm* tiene una heredabilidad del 60-65% (31, 32).

Por otro lado, estudios de asociación de genoma completo (*Genome Wide Association Studies, GWAS*) y posteriores estudios de validación en distintas cohortes, han sugerido la existencia de polimorfismos de un solo nucleótido (*Single Nucleotide Polymorphisms, SNPs*) en ciertos genes que podrían desempeñar un papel en la etiopatogenia de la *OAm* (23, 33, 34). Estos genes pueden agruparse en tres áreas de acuerdo al papel que juegan en la enfermedad: (i) aquellos asociados con rutas de señalización de factores de crecimiento, (ii) aquellos que contribuyen al mantenimiento de la integridad y a la calcificación de la MEC del cartílago y (iii) aquellos relacionados con la inflamación (23).

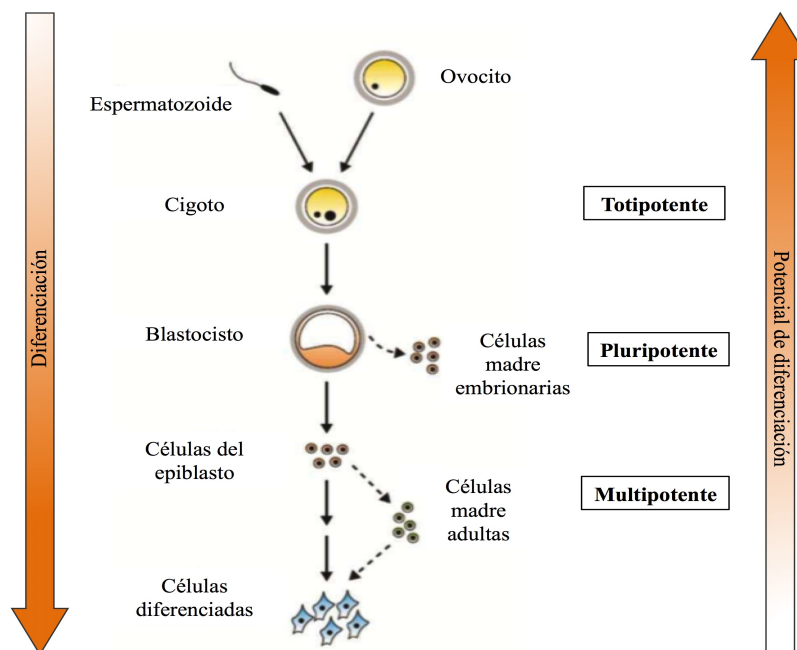
Los *SNPs* son cambios de un solo par de bases en la secuencia de ADN, que ocurren con alta frecuencia en el genoma humano. Aunque la gran mayoría de ellos tiene un impacto mínimo en los sistemas biológicos, los *SNPs* pueden tener consecuencias funcionales cuando afectan a la secuencia de aminoácidos, provocando alteraciones en la transcripción y modificando la afinidad de factores de transcripción (35).

### **3. CÉLULAS MADRE**

#### **3.1. Clasificación**

Las células madre se clasifican comúnmente en función de su origen en células madre adultas (*adult stem cells, ASCs*) y células madre embrionarias (*embryonic stem cells, ESCs*). Por otro lado, también pueden clasificarse en base a su potencia, la cual se define como la capacidad para originar distintos tipos celulares mediante un proceso conocido como diferenciación celular. Así, podemos distinguir células madre totipotentes/omnipotentes, pluripotentes y multipotentes (36-38).

El desarrollo de los organismos multicelulares comienza con una única célula denominada cigoto, la cual se divide de manera regulada y rápida durante la gestación. Las células de las dos primeras divisiones son células madre totipotentes, ya que son capaces de generar tanto tejidos embrionarios como extraembrionarios (placenta). Conforme estas células se dividen, su potencia para dar lugar a tejidos extraembrionarios desaparece, pasando a ser células madre pluripotentes, es decir, capaces de dar lugar a células de las tres capas germinales: endodermo, ectodermo y mesodermo. De este modo, son células que pueden generar todos los tejidos y órganos del cuerpo (Figura 6).



**Figura 6.** Estadios de diferenciación celular y potencial de diferenciación durante las distintas etapas del desarrollo. Imagen obtenida y adaptado de Hochedlinger y Jaenisch, 2002 (39).

Al final del desarrollo embrionario, y conforme estas células se diferencian en otros linajes celulares, su potencia disminuye, dando lugar a células multipotentes y, finalmente, unipotentes (36).

### 3.2. Células madre pluripotentes

Las células madre pluripotentes (*pluripotent stem cells*, *PSCs*) se caracterizan por (i) su capacidad de proliferar indefinidamente en cultivo (autorenovación), (ii) clonalidad, es decir, normalmente se originan de una única célula y (iii) su capacidad para dar lugar a células procedentes de las tres capas embrionarias (36, 38).

Se han derivado diferentes tipos de *PSCs* a partir de distintas fuentes, como las *ESCs* (40, 41), las células madre epiblasticas (42, 43), células germinales embrionarias (44), células progenitoras de gametos (45) y células de carcinomas embrionarios (46, 47). Además, se han generado *in vitro* células pluripotentes mediante manipulación genética de células somáticas (*induced pluripotent stem cells*, *iPSCs*) (48, 49).

### 3.3. Inducción de la pluripotencia: células madre pluripotentes inducidas o *iPSCs*

Durante muchos años y de acuerdo con el "paisaje epigenético" propuesto por Conrad Waddington (50) (Figura 7), la diferenciación celular se entendía como un proceso que ocurría en sentido único, es decir, desde un estado inmaduro hacia un estado

diferenciado más maduro. Se pensaba además que la información genética innecesaria se eliminaba o se inactivaba de forma definitiva en aquellas células completamente diferenciadas o comprometidas con un estado de diferenciación específico (51).

En el año 1962, Sir John Gurdon logró generar ranas clonadas al transferir el núcleo de la célula somática de un renacuajo a un ovocito, demostrando que las células somáticas retienen toda la información genética y que, además, éstas podían revertir su estado diferenciado mediante manipulación artificial (52). Por otro lado, Davis y colaboradores demostraron que la expresión forzada del gen de diferenciación miogénica 1 (*Myod1*) permitía la conversión directa de fibroblastos de ratón en mioblastos (53).

Estos dos descubrimientos, la transferencia somática nuclear (*somatic nuclear transfer*, *SNT*) y la reprogramación directa, sentaron las bases para desarrollar el concepto de “inducción de la pluripotencia”. Así, en el año 2006, un grupo de investigadores japoneses liderados por Sinya Yamanaka demostraron que era posible activar una serie de genes en las células somáticas que revirtieran su estado diferenciado hacia un estadio pluripotente.

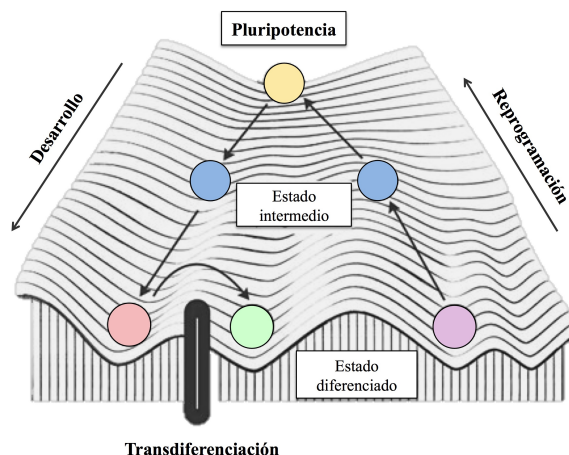
Estos autores utilizaron retrovirus para introducir y forzar la expresión de cuatro factores de transcripción [*octamer-binding transcription factor 4* (*Oct4*), *sex determining region Y-box 2* (*Sox2*), *Kruppel-like factor 4* (*Klf4*), *avian myelocytomatosis viral oncogene homolog c* (*c-Myc*)] (*OSKM*) en fibroblastos de ratón, reprogramando así estas células y haciendo que se comportaran de un modo similar a las *ESCs*. Dado que la pluripotencia de los fibroblastos de ratón fue inducida de manera artificial, denominaron a las células generadas “células madre pluripotentes inducidas” o *iPSCs* (48). Un año después y utilizando la misma metodología, estos autores consiguieron reprogramar fibroblastos humanos y generar así las primeras *iPSCs* humanas (49). Paralelamente y en el mismo año, Yu y colaboradores consiguieron reprogramar fibroblastos humanos utilizando los factores de transcripción *Oct4*, *Sox2*, *Nanog* y *Lin28* (54).

Desde entonces, se han generado *iPSCs* de manera exitosa a partir de una gran cantidad de especies, como primates no humanoides, perro, caballo, cerdo, oveja, vacas y búfalos, entre otros (55, 56); aunque la mayor parte de los estudios se desarrollan con *iPSCs* humanas o de ratón. Del mismo modo, se han generado *iPSCs* a partir de distintos tipos de células somáticas (57, 58).

---



A pesar de que la eficiencia de reprogramación varía entre los distintos tipos de células, en general se suelen reprogramar tipos celulares abundantes y de fácil disponibilidad tales como fibroblastos, queratinocitos o células sanguíneas (59, 60).



**Figura 7.** Plasticidad de la diferenciación celular en el paisaje epigenético de Waddington. Imagen obtenida y adaptada de: <https://www.ptglab.com/news/blog/cell-fate-commitment-and-the-waddington-landscape-model/>

### 3.3.1. Eficiencias de reprogramación

Si bien una gran variedad de células somáticas se puede reprogramar hacia un estado pluripotente mediante la expresión ectópica de distintos factores de transcripción, el proceso es todavía altamente ineficiente (<1%) (61). Se ha demostrado que el tipo de célula somática seleccionado tiene un efecto significativo en la eficiencia de dicho proceso (60). Sin embargo, es difícil realizar una comparación de eficiencias en función del tipo de célula reprogramada debido, fundamentalmente, a la gran variedad de factores transcripcionales y métodos de reprogramación utilizados (62).

La base para esta baja eficiencia puede reflejar que se requieren eventos celulares específicos y, en muchos casos, todavía desconocidos, para generar *iPSCs* y que éstos dependen de una multitud de factores, como el tipo de célula inicial, el estado del ciclo celular y la capacidad para experimentar la replicación, la variabilidad en la reactivación de los genes que mantienen la pluripotencia, eventos epigenéticos y otros eventos estocásticos (61, 63). Otros autores han sugerido que estas variaciones en las eficiencias de reprogramación podrían deberse a las diferencias en los niveles de expresión endógenos de *c-Myc* y *Klf4* (61) o el grado de metilación de los promotores de *NANOG* y *OCT4* (64).

Por otro lado, se ha demostrado que la mayoría de las vías supresoras de tumores actúan como una barrera en la generación de *iPSCs* (63, 65). Sin embargo y, aunque se han realizado estudios de inhibición de supresores de tumores para mejorar la eficiencia de la reprogramación, esto podría causar problemas de seguridad en las *iPSCs* generadas, disminuyendo las posibilidades de aplicación de estas células (66).

### **3.3.2. Factores de transcripción en el proceso de reprogramación**

El proceso de reprogramación requiere de la introducción de distintos factores de transcripción en las células somáticas, fundamentalmente *Oct4*, *Sox2*, *Klf4*, *Nanog*, *Lin28* y/o *c-Myc* (48, 54). Estos factores de transcripción reconocen secuencias específicas de ADN y bien activan o previenen su transcripción uniéndose tanto a elementos de ADN próximos a sus promotores como a regiones más alejadas (67).

Los factores de transcripción identificados inicialmente por Takahashi y Yamanaka en el año 2006, también conocidos como "factores de Yamanaka", constituyen los cuatro factores más utilizados para la reprogramación de células somáticas (68, 69). Sin embargo, también se han estudiado nuevas combinaciones de factores con el fin de eliminar aquellos considerados potencialmente peligrosos, como por ejemplo el proto-oncogén *c-Myc*.

Se ha demostrado que la desregulación de *c-Myc* puede desencadenar inestabilidad genómica e inducir el desarrollo de cáncer, lo cual representa un gran inconveniente para la aplicación traslacional de las *iPSCs* (70-72). Algunos estudios han sugerido que *c-Myc* podría ser prescindible para la reprogramación, aunque la eficiencia del proceso se reduce, ocurriendo con una frecuencia inferior al 0,001% (71-74). Es por eso que muchos investigadores han centrado sus esfuerzos en probar nuevas combinaciones de factores que permitan eliminar *c-Myc*, mientras mantienen la misma eficiencia de reprogramación (54, 71, 72).

Por otro lado, también se ha demostrado que la adición de determinados compuestos al medio de cultivo podría substituir a los factores de reprogramación *Sox2* y *Klf4*, siempre y cuando la célula somática seleccionada para reprogramar presente niveles endógenos elevados de ambos factores (75, 76).

*Oct4* forma un heterodímero con *Sox2* y puede funcionar como un activador o represor de la transcripción induciendo la expresión de *NANOG* (77).

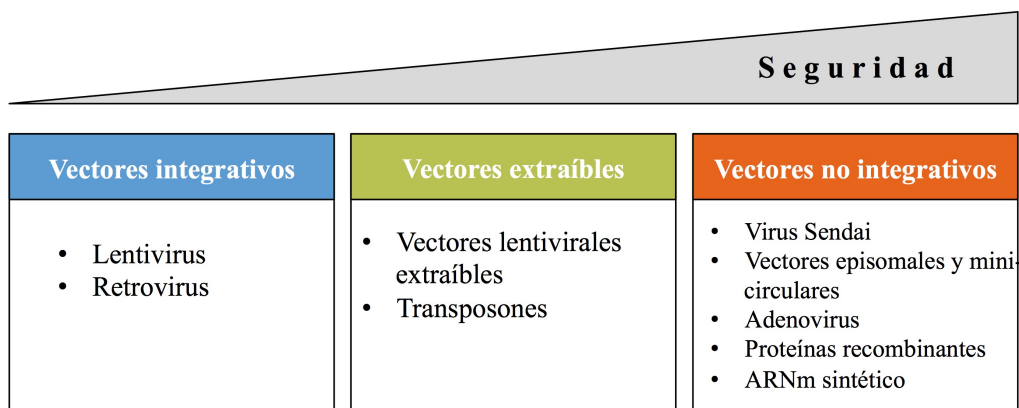
Hasta el año 2010, se pensaba que este factor era el único imprescindible para inducir la pluripotencia en células somáticas (78). Sin embargo, estudios posteriores han sugerido que el receptor nuclear Nrs5a2 (79) o distintos compuestos químicos (80) podrían reemplazar también al factor de transcripción *Oct4*.

### **3.3.3. Sistemas de reprogramación**

Un proceso clave a la hora de inducir la pluripotencia es introducir los factores de transcripción en las células diana. Para este propósito se han descrito distintos sistemas, pero todos ellos presentan diferencias significativas en las tasas de aneuploidía, la eficiencia de la reprogramación, la seguridad y la carga de trabajo que llevan asociada (81). Generalmente, los distintos sistemas de reprogramación se agrupan atendiendo a su naturaleza viral (vectores virales y no virales) (72, 82), aunque también pueden agruparse de acuerdo con su capacidad de integración en el genoma de la célula huésped (sistemas integrativos y sistemas no integrativos).

En los métodos integrativos, el ADN exógeno permanece en el genoma de las *iPSCs* generadas. Dentro de estos métodos, destaca el uso de retrovirus y lentivirus (72, 83). Por ejemplo, Takahasi y Yamanaka utilizaron vectores retrovirales para generar las primeras *iPSCs* a partir de fibroblastos de ratón, alzando una eficiencia aproximada del 0,02% (48). Sin embargo y, debido a que los retrovirus sólo son capaces de transfectar células en división, se han utilizado también vectores lentivirales con el fin de aumentar la eficiencia del proceso (54, 84).

A pesar de que los retrovirus y los lentivirus son los sistemas de reprogramación más utilizados para la reprogramación celular, el proceso de integración puede producir alteraciones cromosómicas e influir así en las propiedades de las líneas celulares que se obtengan. De hecho, se ha visto que las *iPSCs* generadas utilizando vectores retrovirales tienen una mayor tasa de aneuploidía en comparación con otros sistemas de reprogramación (62). Con el fin de minimizar o eliminar las alteraciones en el genoma de las *iPSCs* a la vez que se mantiene o aumenta la eficiencia del proceso, se han desarrollado distintos sistemas de reprogramación que se engloban dentro de los métodos no integrativos. Entre estos métodos destacan los vectores lentivirales extraíbles, transposones, vectores virales no integrativos (adenovirus y virus Sendai), vectores episomales y minicirculares, proteínas recombinantes, vectores sintéticos de ARNm o reprogramación química (85) (Figura 8).



**Figura 8.** Representación esquemática de la seguridad de los distintos métodos de reprogramación. Imagen obtenida y adaptada de: <http://assets.thermofisher.com/TFS-Assets/LSG/brochures/pluripotent-stem-cell-guidebook.pdf>

El virus Sendai (*Sendai virus*, *SV*) constituye, entre todos estos métodos, uno de los sistemas más eficientes y seguros para realizar la reprogramación de células somáticas. Además, es especialmente eficaz a la hora de trabajar con células difíciles de reprogramar y para realizar experimentos en los que son necesarias altas eficiencias de reprogramación e *iPSCs* libres de alteraciones en el genoma (“*footprint-free iPSCs*”) (81).

El *SV* es un virus con envuelta de ARN monocatenario. Su genoma codifica para proteínas estructurales que forman la envuelta viral, las distintas subunidades de la ARN polimerasa, el receptor de ácido siálico o hemaglutinina-neuraminidasa y una proteína de fusión que, cuando se activa por la acción de una proteasa, fusiona la envuelta viral con la membrana de la célula que va a infectar. Entre sus características, el *SV* destaca por dos propiedades fundamentales: (i) es un virus capaz de infectar un amplio rango de células de distintas especies animales dado que el ácido siálico, el mecanismo por el cual el *SV* infecta a las células, está presente en la superficie de una gran variedad de tipos celulares y (ii) los vectores de ARN del virus permanecen en el citoplasma, de manera que no se integran en el genoma de la célula huésped y no alteran la información genética de la misma (86, 87).

En los vectores de *SV* utilizados en la reprogramación celular, el gen que codifica para la proteína de fusión se encuentra deletado y, además, se introducen mutaciones para que ciertas proteínas sean sensibles a la temperatura. Estas modificaciones evitan la transmisión y propagación de los vectores virales hasta que, finalmente, son eliminados del citoplasma de las células huésped (86, 88). Por otro lado, entre los inconvenientes de la utilización de este sistema se incluyen la dificultad para probar otros factores de

reprogramación debido a la dependencia de un kit comercial, la eliminación relativamente lenta del ARN de *SV* y la actual falta de *SV* de grado clínico para la reprogramación (62).

### **3.3.3. Cultivo y caracterización de las iPSCs**

#### **3.3.3.a. Cultivo**

El cultivo de las *iPSCs* requiere de una combinación adecuada de medio de cultivo, matrices y métodos de subcultivo que mantengan la línea celular en buenas condiciones y que, además, mantengan su pluripotencia. En los últimos años se han desarrollado una gran variedad de combinaciones o “sistemas de cultivo” con el fin de satisfacer las necesidades de un tipo celular tan exigente como son las *iPSCs*.

De modo general, el cultivo de las *iPSCs* se puede clasificar en: sistemas de cultivo basados en el uso de células alimentadoras o células *feeder* (*feeder-systems*) y sistemas de cultivo libres de células alimentadoras o células *feeder* (*feeder-free systems*) (89).

Los sistemas de cultivo con células *feeder* se basan en el uso de fibroblastos mitóticamente inactivados para enriquecer el medio de cultivo con factores de crecimiento y proteínas de la MEC necesarios para el cultivo *in vitro* de las *iPSCs*. Las células alimentadoras o *feeders* se utilizaron por primera vez para el aislamiento *in vitro* y cultivo de *ESCs* humanas (41). Se trata de una metodología de cultivo muy robusta y, por ello, todavía se utiliza con gran frecuencia a pesar del desarrollo de sistemas libres de *feeders*, en los cuales se suplementa el medio de cultivo con distintos factores de crecimiento y proteínas, con el fin de compensar la ausencia de células alimentadoras. Esta estrategia proporciona un entorno apto para realizar experimentos de análisis molecular o de citometría de flujo (89).

En ocasiones, es preciso cambiar de un sistema de cultivo con *feeders* a uno libre de *feeders*. Dicha transición puede resultar especialmente dañina para las células, sobre todo en el caso de líneas sensibles, por lo que el protocolo de adaptación debe ajustarse en función de las células utilizadas (90). En ambos sistemas es necesario realizar un correcto mantenimiento de los cultivos. Esto implica, fundamentalmente, realizar cambios de medio a diario y evitar la diferenciación celular realizando subcultivos regularmente.

A la hora de subcultivar las células es importante tener en cuenta que, salvo necesidades

---

experimentales especiales, éstas deben levantarse en forma de agregados/fragmentos. Encontrar el tamaño óptimo de dichos fragmentos es fundamental para mantener las líneas de *iPSCs*, ya que fragmentos demasiado grandes o demasiado pequeños tienden a diferenciarse o no son capaces de adherirse nuevamente al cultivo (89, 91).

### **3.3.3.b. Caracterización**

La generación de una nueva línea de *iPSCs* requiere la confirmación de la calidad de la misma mediante un proceso de caracterización. Dicho proceso consiste en una serie de pruebas que testan la pluripotencia de la línea generada y detecta anomalías que puedan afectar al comportamiento celular y su seguridad (Maherali and Hodchenlinger, 2008). A continuación, se describen las pruebas que por lo general se llevan a cabo para caracterizar las nuevas líneas de *iPSCs* (92-94):

- Evaluación de la morfología. La morfología de las colonias de *iPSCs* debe ser idéntica a las *ESCs*, esto es, con una ratio núcleo/citoplasma elevado, nucléolos prominentes y bordes muy marcados cuando se cultivan sobre células *feeder*.
- Perfil de expresión génica. A nivel molecular, las *iPSCs* deben presentar un perfil de marcadores similar a las *ESCs*. Normalmente, se estudian la expresión de genes asociados a la pluripotencia tales como *NANOG*, *CRIPTO*, *OCT4*, *SOX2* o *REX1*. Además, es necesario comprobar el silenciamiento o la eliminación de los vectores utilizados para la introducción de los factores de reprogramación en las células diana.
- Marcadores de pluripotencia. Pueden detectarse estos marcadores estudiando actividades enzimáticas específicas, como la de la fosfatasa alcalina, una enzima que se encuentra sobreexpresada en las *PSCs* y que puede detectarse empleando un sustrato que aporta coloración azul como resultado de la actividad enzimática (95). Por otro lado, también pueden realizarse técnicas de inmunocitoquímica/microscopía o inmunocitoquímica/citometría de flujo para detectar marcadores tanto de superficie (*TRA-1-60*, *TRA-1-81*, *SSEA3*, *SSEA4*) como intracelulares (*NANOG*, *OCT4*).
- Potencial de diferenciación. Es necesario confirmar la capacidad de las *iPSCs* para diferenciarse hacia células de las tres capas germinales: endodermo, ectodermo y mesodermo. Este estudio puede llevarse a cabo *in vivo*, mediante ensayos de

formación de teratomas, o *in vitro*, mediante ensayos de formación de cuerpos embrionarios (*embryoid bodies*, *EBs*).

- Evaluación de la estabilidad genética. Se ha demostrado que largos períodos de cultivo pueden generar alteraciones cromosómicas en las células *iPSCs*. Es por ello que se hace necesario verificar la ausencia de alteraciones mediante técnicas de cariotipado. La técnica realizada con más frecuencia para detectar cambios en la dotación cromosómica de las *iPSCs* es el cariotipo convencional por bandas G.
- Identificación celular. Con el fin de confirmar que la línea de *iPSCs* generada procede de la célula somática de origen, así como para detectar la presencia de secuencias de ratón que indicaría la contaminación por células *feeder* (si es el caso), es necesario estudiar la huella genética, tanto en la línea original como en la línea generada, mediante análisis de microsatélites (*short tandem repeats*, *STRs*).

#### **3.3.4. Aplicaciones de las iPSCs**

Las *iPSCs* presentan varias características que las convierten en una fuente celular con gran potencial en biomedicina. Por un lado, constituyen una fuente accesible e inagotable de células con potencial para diferenciarse, bajo el estímulo adecuado, hacia cualquier tipo celular del cuerpo. Por otro lado, representan una fuente de *PSCs* específicas de cada paciente y, a pesar de que la posibilidad de una respuesta inmunológica y el rechazo de las *iPSCs* por parte de un paciente receptor no se puede excluir completamente, se espera que reduzcan la respuesta inmune cuando se trasplantan (96). Finalmente, las *iPSCs* eluden los problemas éticos relacionados con el uso de *ESCs* humanas, ya que se pueden obtener *PSCs* sin necesidad de destruir embriones humanos (97).

Teniendo en cuenta estas propiedades y, además de su utilidad en investigaciones básicas en biología del desarrollo, a las *iPSCs* se les reconocen tres aplicaciones fundamentales: (i) su utilidad como modelos celulares *in vitro* para el estudio de enfermedades humanas, (ii) su utilidad para el testado de fármacos *in vitro* y (iii) su posible uso terapéutico en medicina regenerativa (67). De hecho, se han realizado una gran cantidad de estudios en los que se implementa la utilización de las *iPSCs* para investigar la disfunción de diversos tejidos tanto a nivel celular como molecular y, también, para tratar enfermedades de base genética y no genética (96).

#### **4. CÉLULAS MADRE PLURIPOTENTES INDUCIDAS EN EL ESTUDIO Y TRATAMIENTO DE LA ARTROSIS**

El hecho de que las *iPSCs* humanas produzcan de manera espontánea cartílago funcional en los ensayos de formación de teratomas (54, 98), hace de estas células una fuente celular prometedora, tanto para aplicaciones de medicina regenerativa del cartílago como para estudiar *in vitro* mecanismos de enfermedad y testar nuevos tratamientos.

Por otra parte, la ilimitada capacidad de renovación y la capacidad de diferenciación condrogénica de las *iPSCs* (99) suponen una clara ventaja frente a la utilización de condrocitos, que, al precisar proliferar en cultivo para obtener un número suficiente de células, experimentan una progresiva desdiferenciación celular, con la consiguiente pérdida de características condrogénicas.

Sin embargo, para utilizar la tecnología de las *iPSCs* en el tratamiento del daño en el cartílago, el testado de fármacos y, además, aplicarlas en el modelado de enfermedades, es necesario desarrollar protocolos que permitan obtener una condrogénesis *in vitro* sólida (100).

##### **4.1. Estrategias para la diferenciación condrogénica de las *iPSCs***

El conocimiento actual sobre la condrogénesis de las *iPSCs* todavía se encuentra en su infancia y, por lo tanto, falta estandarización, lo que lleva a que se hayan desarrollado gran cantidad de metodologías diferentes que muestran resultados muy variables (101).

Por lo general, los protocolos para diferenciar condrogénicamente las *iPSCs* se pueden agrupar en tres-cuatro categorías (102): (i) co-cultivo con condrocitos primarios, (ii) a través de la formación de *EBs* y (iii) utilizando combinaciones de factores de crecimiento. Todos estos métodos se basan en la transición por un estado de células similares a *MSCs*, sin embargo, algunos autores realizan protocolos específicos para obtener una población intermedia de *MSCs* que luego diferencian a condrocitos, estableciendo así una cuarta categoría: (iv) a través de la inducción de células similares a *MSCs*.

- Co-cultivo con condrocitos primarios. La principal ventaja del co-cultivo es que los factores paracrinós secretados por los condrocitos pueden estimular la diferenciación condrogénica de las *iPSCs*, al recapitular *in vitro* el entorno



encontrado en el tejido *in vivo* (102, 103). Por el contrario, se ha sugerido que las condiciones de co-cultivo pueden aumentar el riesgo de contaminación de las células diferenciadas con otras células no deseadas (104).

- Formación de cuerpos embrionarios o EBs. La diferenciación condrogénica *in vitro* de las *iPSCs* a través de la formación de *EBs* es la aproximación más común para obtener condrocitos derivados de *iPSCs* humanas (105). Su estructura tridimensional (3D) se considera similar a la del embrión temprano posterior a la implantación y, por lo tanto, las células en los *EBs* deben poder diferenciarse en células de las tres capas germinales (106).
- Factores de crecimiento. Estos protocolos consisten en la administración de distintos factores de crecimiento tales como proteínas morfogénicas de hueso (*bone morphogenic proteins, BMPs*), factores de crecimiento transformante (*transforming growth factors, TGFs*), factores de crecimiento similares a la insulina (*insulin-like growth factors, IGFs*) y factores de crecimiento fibroblástico (*fibroblast growth factors, FGFs*). Dado que este enfoque se basa en reproducir los eventos que tienen lugar durante el desarrollo embrionario y que "dirigen" el proceso de diferenciación, también se conoce como "diferenciación dirigida" (100, 105).
- Diferenciación hacia células similares a MSCs. Dado que las *MSCs* pueden diferenciarse en los linajes condrogénico, osteogénico y adipogénico (107, 108), y que la condensación mesenquimal es un requisito previo para la inducción de condrogénesis durante la formación de cartílago embrionario (104), otra estrategia de diferenciación se basa en estimular primero la diferenciación de las *iPSCs* en una población similar a *MSCs*, seguida de su diferenciación hacia condrocitos. Para establecer poblaciones similares a *MSCs* a partir de *iPSCs*, se han investigado varias metodologías, incluyendo el uso de distintas matrices (109), factores de crecimiento (110) y formación de *EBs* (111, 112).

#### **4.2. Aplicaciones de las *iPSCs* en el estudio y tratamiento de la artrosis**

Actualmente, no se dispone de protocolos robustos y reproducibles para inducir la condrogénesis de las *iPSCs*. Quizás sea esta la razón por la que existen pocos estudios sobre aplicaciones de estas células en el estudio y tratamiento de la *OA* (104) en comparación con otras enfermedades, como trastornos neurodegenerativos o

---

cardiomiopatías (113). Sin embargo, con la optimización de los protocolos actualmente disponibles, las *iPSCs* están destinadas a ser una herramienta prometedora en el descubrimiento de fármacos, el modelado de la enfermedad y las terapias regenerativas para tratar y reparar pequeños defectos condrales, evitando que progresen y den lugar a *OA*.

#### **4.2.1. *iPSCs* en el modelado *in vitro* de la artrosis**

El modelado *in vitro* de una enfermedad consiste en la recapitulación de la misma en una placa de Petri. La idea subyacente se basa en la obtención de *iPSCs* a partir de las células somáticas de un paciente y, a continuación, estimular su diferenciación *in vitro* hacia el tipo celular de interés (114).

Se ha descrito que las *iPSCs* específicas de paciente son útiles para estudiar enfermedades complejas afectadas por varios factores, como los antecedentes genéticos y las modificaciones ambientales (115, 116). Dado que la *OA* presenta una fisiopatología compleja, la utilización de las *iPSCs* como modelo celular *in vitro* de la enfermedad podría ayudarnos a profundizar en el estudio de sus bases moleculares. En este sentido, se han generado *iPSCs* a partir de pacientes con *OA* de cadera (117) y se ha observado que condrocitos derivados de *iPSCs* reflejaban cambios descritos en la *OA* avanzada (118).

Por otro lado, y tal como se comentó en apartados anteriores, se han descrito distintos *SNPs* que podrían desempeñar un papel en la etiopatogenia de la *OA* y sus subtipos (34). El establecimiento de modelos de *OA* basados en *iPSCs* portadoras de dichos *SNPs* podría ayudar a identificar moléculas y eventos clave en el desarrollo y la progresión de la *OA* directamente en el tipo de célula afectada.

#### **4.2.2. *iPSCs* en el testado de fármacos en la artrosis**

Antes de realizar ensayos clínicos en humanos, la toxicidad de cualquier nuevo fármaco debe de testarse en modelos animales con el fin de obtener información sobre los efectos del mismo y conocer también sus posibles efectos secundarios (37). Sin embargo, los modelos animales actualmente disponibles tienen una serie de limitaciones. Por un lado, animales y humanos poseen diferencias significativas en cuanto a antecedentes genéticos, anatomía y fisiopatología. Por otro lado, son incapaces de replicar exactamente las condiciones fisiológicas humanas (113, 119). Además, algunos

compuestos pueden no ser tóxicos en la especie animal pero sí serlo en humanos (37).

En lo que respecta a la *OA*, el progreso de la enfermedad es más lento en los seres humanos que en los animales y los cambios patológicos del modelo animal de *OA* pueden no ser totalmente equiparables con los de la enfermedad humana (116). Es por ello que surge la necesidad de desarrollar nuevos sistemas de búsqueda y testado de fármacos que simulen las condiciones humanas y conseguir así que los resultados sean más extrapolables. En este sentido, el uso de *iPSCs* constituye una alternativa a las pruebas farmacológicas y toxicológicas convencionales, ya que permite la generación de tipos celulares específicos de enfermedades humanas, lo que conlleva una mejor predicción de la respuesta terapéutica y la toxicología (38).

Se han analizado distintos fármacos en modelos de *iPSCs* de diferentes enfermedades (96). Con respecto a la *OA*, Willard y colaboradores analizaron una selección de fármacos candidatos para la *OA* en *iPSCs* murinas y observaron que el inhibidor de *NF- $\kappa$ B*, SC-514, reducía eficazmente la degradación del cartílago en respuesta a condiciones inflamatorias (99). Además del testado de fármacos, las *iPSCs* son una herramienta valiosa para buscar compuestos o factores de crecimiento que pueden mejorar los protocolos de diferenciación condrogénica actuales (120, 121).

Estos estudios ilustran que el uso de *iPSCs* como plataforma de detección podría sentar las bases para una medicina más precisa y personalizada, que permitiría el estudio del efecto de nuevos fármacos a nivel individual (122). La combinación de estas plataformas de detección con una “librería” de *iPSCs* de diferentes pacientes con la misma enfermedad podría proporcionar información sobre el efecto de dichas moléculas en función de la variación genética y epigenética de una población (113).

#### **4.2.3. *iPSCs* en la medicina regenerativa del cartílago**

Debido a la naturaleza avascular y aneural del cartílago articular, además del limitado acceso de células madre, la capacidad de reparación intrínseca de este tejido es muy limitada. Esto hace que pequeñas lesiones en el cartílago debidas a un traumatismo o a una enfermedad tiendan a empeorar progresivamente y puedan llevar al desarrollo de patologías más complejas, como la *OA* (121, 123, 124).

A pesar de la alta prevalencia y el elevado coste asociado a esta enfermedad, hoy en día no existen fármacos que promuevan la reparación de las lesiones en el cartílago articular.

Actualmente, la *OA* recibe tratamientos farmacológicos que mejoran la función articular, disminuyen el dolor y retardan su avance (125) pero, en la fase final de la misma, se procede comúnmente al reemplazamiento protésico (11).

Los tratamientos basados en la medicina regenerativa y la ingeniería tisular del cartílago podrían ofrecer nuevas soluciones para preservar, reparar y restaurar la integridad del cartílago articular. Tratando de manera temprana pequeños defectos o defectos focales en el cartílago, se podría evitar o reducir la progresión del daño y, con ello, la degradación generalizada que se ve en la *OA* (11, 126).

**Tabla II.** Resumen de los estudios realizados en ingeniería tisular del cartílago utilizando *iPSCs*.

Referencia	Célula somática de partida	<i>In vitro</i> / <i>In vivo</i>	Modelo animal	Animal
Kim <i>et al.</i> , 2011 (117)	Sinoviocitos <i>OA</i> humanos	<i>In vitro</i>	-	-
Diekman <i>et al.</i> , 2012 (123)	Fibroblastos dermales de ratón	<i>In vitro</i>	-	-
Wei <i>et al.</i> , 2012 (103)	Condrocitos <i>OA</i>	Ambos	Implante subcutáneo	Ratón
Uto <i>et al.</i> , 2013 (127)	Líneas celulares ASP0001 e iPS-MEF-Ng-20D-17	Ambos	Defecto focal en rótula	Ratón
Cheng <i>et al.</i> , 2014 (106)	Fibroblastos dermales humanos y <i>ESCs</i>	<i>In vivo</i>	Defecto osteocondral en fémur	Rata
Ko <i>et al.</i> , 2014 (128)	Línea celular de <i>iPSCs</i> humanas SC802A-1	<i>In vivo</i>	Defecto osteocondral en fémur	Rata
Liu <i>et al.</i> , 2014 (129)	<i>iPSCs</i> de ratón	<i>In vivo</i>	Defecto focal en rodilla	Conejo
Lee <i>et al.</i> , 2015 (115)	Fibroblastos dermales humanos	Ambos	Implante subcutáneo	Ratón
Saito <i>et al.</i> , 2015 (130)	Fibroblastos dermales neonatales humanos	<i>In vivo</i>	Defecto en el cartilago de cóndilos femorales mediales	Ratón
Yamashita <i>et al.</i> , 2015 (121)	Línea de <i>iPSCs</i> humanas 409B2 y línea de ratón 604B1	Ambos	Implante subcutáneo. Defecto en la superficie articular de la rodilla	Ratón Rata Cerdo
Nguyen <i>et al.</i> , 2017 (131)	Línea celular A2B	<i>In vitro</i>	-	-

Abreviaturas: *OA* (artrosis), *ESCs* (células madre embrionarias), *iPSCs* (células madre pluripotentes inducidas).

Las *iPSCs* son una herramienta con gran potencial en ingeniería tisular del cartílago, ya que suponen una fuente accesible y abundante de células autólogas con capacidad de diferenciarse condrogénicamente. Por el contrario, otras fuentes celulares como las

*MSCs* o los condrocitos son difíciles de obtener y a menudo muestran cambios en su fenotipo y potencial de diferenciación después de varios subcultivos (123).

Los estudios que utilizan *iPSCs* humanas muestran que los condrocitos derivados de *iPSCs* humanas se *pueden* cultivar en cultivos 3D o *scaffolds* para crear un tejido similar al cartílago tanto *in vitro* como *in vivo* (102), aunque con diferentes resultados en términos de la calidad del neocartílago obtenido. En la tabla II se recogen los estudios llevados a cabo hasta la fecha utilizando *iPSCs* con este propósito.

#### **4.2.3.a. Impresión 3D de *iPSCs***

La impresión 3D de combinaciones de células y biomateriales para generar un tejido similar al cartílago constituye un enfoque pionero en la ingeniería tisular osteocondral. Esta estrategia consiste en colocar sucesivas capas de material en diferentes formas; cada una de estas capas se imprime directamente sobre la anterior de acuerdo con un patrón previamente programado (132).

La forma y el patrón de impresión de los constructos 3D es extremadamente precisa, lo que tiene una gran importancia cuando se trata de reconstruir estructuras específicas (133). Así, la impresión 3D permite distribuir células y biomateriales de manera específica, con la finalidad de recrear la microarquitectura de distintos tejidos.

La elección del material utilizado determina qué tecnología de bioimpresión se puede utilizar (133). Así, se puede dispensar el material en forma de gotas mediante el uso de inyección de tinta, microválvulas y técnicas asistidas por láser, o bien mediante dispensación continua, como es el caso de las impresoras de microextrusión (134). En todos los casos, para que un material sea adecuado para la bioimpresión 3D, debe ser lo suficientemente viscoso para poder pasar a través de las jeringuillas y debe tener capacidad de reticulación, de modo que pueda mantener la estructura 3D deseada después de la impresión (134, 135).

Los hidrogeles constituyen materiales atractivos para ser utilizados como biotintas, ya que son por lo general biocompatibles y de baja citotoxicidad. Además, su alto contenido en agua les confiere mayor similitud estructural con la MEC (134). Los materiales naturales más ampliamente utilizados en técnicas de bioimpresión son el Col, el ácido hialurónico, el quitosano y el alginato (133). Concretamente, los alginatos aislados de algas pardas han demostrado buenas propiedades para utilizarse como

biotintas (131, 133-136). Sin embargo, para facilitar la impresión de los materiales y mantener la estructura de los constructos 3D tras la impresión, los hidrogeles a menudo se imprimen en combinación con otros materiales como por ejemplo las nanofibrillas de celulosa, fibrillas con una dimensión en el rango de los nanómetros, las cuales son atractivas para aplicaciones biomédicas debido a sus buenas propiedades mecánicas y su biocompatibilidad (134). Finalmente, los hidrogeles pueden contener otras moléculas que faciliten la adhesión de las células al material utilizado como biotinta y mejorar así la viabilidad celular tras la impresión. Para ello, normalmente se utilizan proteínas o secuencias de péptidos presentes en la MEC y que presentan motivos reconocibles para las células (137) como pueden ser las lamininas. Estas moléculas son glicoproteínas presentes en la MEC que favorecen la adhesión celular a través de interacciones con distintas integrinas (138).

Esta innovadora estrategia de impresión 3D fue aplicada por primera vez en ingeniería tisular del cartílago utilizando *iPSCs* en el año 2017 por Nguyen y colaboradores. Estos autores imprimieron estructuras tridimensionales compuestas por una mezcla de células *iPSCs* y una biotinta de alginato y celulosa nanofibrilada (*nanofibrillated cellulose, NCF*). Tras estimular la diferenciación condrogénica de las células en el interior de los constructos durante 5 semanas, observaron que se formaba un neot Tejido similar al cartílago que presentaban niveles elevados del marcador condrogénico Col-II (131).

Aunque se trata de una aproximación que todavía está en sus inicios, investigaciones como esta demuestran que la impresión 3D de *iPSCs* podría constituir un tratamiento prometedor para reparar lesiones en el cartílago articular.

## **II. JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS**





El conocimiento actual y los resultados de investigación sobre la *OAm* son escasos, fundamentalmente debido a la baja disponibilidad de muestras para llevar a cabo estudios *in vitro* y a la ausencia de modelos animales que recapitulen las características de la enfermedad. Por otro lado, debido a la naturaleza avascular y aneural del cartílago articular, además del limitado acceso de células madre, la capacidad de reparación intrínseca de este tejido es muy limitada, lo que hace que resulte especialmente difícil tratar enfermedades como la *OA*.

Los tratamientos basados en la medicina regenerativa y la ingeniería tisular podrían ofrecer nuevas soluciones para preservar, reparar y restaurar la integridad del cartílago articular. Sin embargo, resulta fundamental encontrar una fuente celular adecuada que permita superar las limitaciones asociadas a la utilización de otras fuentes celulares, como los condrocitos o las *MSCs*.

El descubrimiento de las células madre pluripotentes inducidas o *iPSCs* supone una nueva herramienta con un gran potencial en Biomedicina ya que pueden emplearse como modelos celulares de enfermedades. En este sentido, las *iPSCs* permiten reproducir enfermedades humanas en una placa de cultivo y usarlas como plataforma para profundizar en su estudio, así como para descubrir nuevos compuestos y dianas terapéuticas. Por otra parte, las *iPSCs* constituyen una fuente celular prometedora para aplicaciones en ingeniería tisular y medicina regenerativa del cartílago, puesto que su utilización elude el conflicto ético derivado de la obtención de células madre embrionarias. Además, la ilimitada capacidad de renovación y la capacidad de diferenciación condrogénica de las *iPSCs* suponen una clara ventaja frente a la utilización de condrocitos o *MSCs*, los cuales, al precisar proliferar en cultivo para obtener un número suficiente de células, experimentan una progresiva desdiferenciación celular, con la consiguiente pérdida de características condrogénicas y de la capacidad de diferenciación.

Teniendo en cuenta esta información, los objetivos planteados en el presente proyecto han sido:

## **OBJETIVO 1:**

### **1. Crear modelos humanos celulares de artrosis de manos y modelos humanos celulares sanos basados en la generación de células madre pluripotentes inducidas.**

- 1.1. Generar células madre pluripotentes inducidas a partir de fibroblastos humanos obtenidos de pacientes con artrosis de manos y donantes sanos.
- 1.2. Caracterizar morfológicamente, fenotípicamente y molecularmente las células madre pluripotentes inducidas generadas.
- 1.3. Estudiar la presencia de polimorfismos de un solo nucleótido asociados a la artrosis de manos en las líneas de células madre pluripotentes inducidas generadas.
- 1.4. Analizar la capacidad de diferenciación condrogénica de las líneas de células madre pluripotentes inducidas generadas y caracterizar fenotípica y funcionalmente las células similares a mesenquimales estromales obtenidas en el estadio intermedio durante el proceso de diferenciación.

## **OBJETIVO 2:**

### **2. Evaluar la capacidad de diferenciación condrogénica de células madre pluripotentes inducidas humanas con el fin de generar *in vitro* tejido similar al cartílago articular mediante técnicas de impresión 3D.**

- 2.1. Realizar la impresión 3D de células madre pluripotentes inducidas utilizando biotintas de celulosa nanofibrilada, alginato y laminina.
- 2.2. Estudiar la viabilidad y la proliferación, a lo largo del tiempo, de las células madre pluripotentes inducidas en el interior de los constructos 3D.
- 2.3. Analizar la capacidad de diferenciación condrogénica de las células madre pluripotentes inducidas en el interior de los constructos 3D.

### **III. MATERIAL Y MÉTODOS DEL OBJETIVO 1**



## **1. Obtención de células somáticas para el proceso de reprogramación**

Este estudio fue aprobado por el Comité de Ética de la Investigación de A Coruña y Ferrol (número de registro 2014/405). Todas las donantes que participaron en el estudio firmaron el consentimiento informado.

Este estudio se realizó de acuerdo a la legislación española que regula la generación de *iPSCs* humanas y siguiendo protocolos aprobados por la Comisión de Seguimiento y Control de la Donación de Células y Tejidos Humanos del Instituto de Salud Carlos III. Las líneas celulares generadas se depositarán en el Banco Nacional de Líneas Celulares (BNLC, ISCIII) tal y como indica la legislación española.

### **1.1. Obtención y procesamiento de biopsias de piel humana**

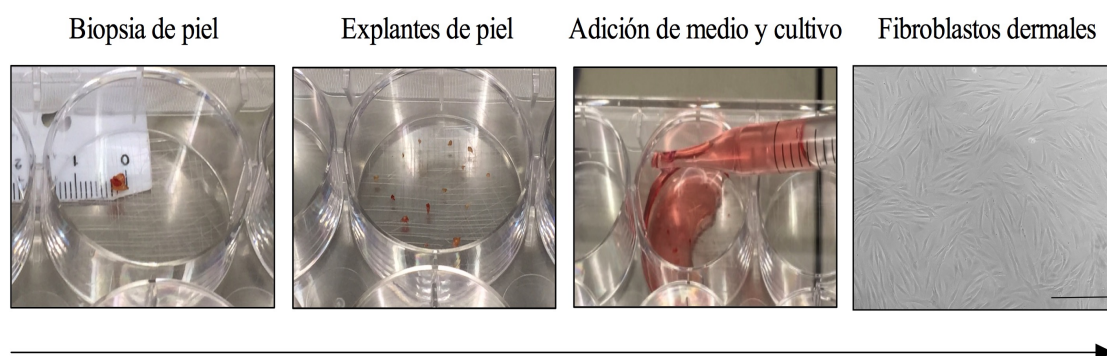
Las biopsias de piel humana se obtuvieron a partir de dos pacientes (mujeres de 52 y 76 años, respectivamente), que presentaban la patología artrósica sólo en manos, y una donante (mujer de 44 años) sin patologías artrósicas y/o artríticas (control sano). A lo largo del manuscrito, estas pacientes se designarán como paciente *OA 1*, paciente *OA 2* y donante sana.

Mediante radiografía, se comprobó que la paciente *OA 1* presentaba *OAm* no erosiva y rizartrosis unilateral derecha. No presentaba *OA* en rodillas ni caderas, pero sí *OA* en la columna lumbar. La paciente *OA 2* presentaba *OAm* no erosiva y rizartrosis bilateral. No presentaba *OA* en rodillas ni caderas. No se disponía de información radiológica de la columna lumbar. La donante sana no presentaba signos de *OA* en manos, rodillas ni caderas.

Se estableció un protocolo de obtención de las muestras en el que, tras la firma del consentimiento informado, se citó en la consulta de Reumatología del Complejo Hospitalario Universitario de A Coruña a las donantes. Se tomaron muestras de piel de 3 mm de diámetro con ayuda de un *punch* para biopsias (*Kai Medical*, Alemania). A cada una de las muestras se le asignó un número aleatorio según la ley de protección de datos de carácter personal. Una vez así etiquetadas, se trasladaron al laboratorio de cultivo celular del Instituto de Investigación Biomédica de A Coruña (INIBIC) para el aislamiento de los fibroblastos en condiciones de esterilidad.

## 1.2. Aislamiento y cultivo de fibroblastos dermales

Para llevar a cabo el aislamiento de los fibroblastos dermales a partir de las biopsias de piel de las donantes, se realizó la técnica de cultivo por explantes (Figura 9). Para ello, las muestras de tejido se cortaron en pequeños fragmentos de <1 mm de diámetro y se depositaron en placas de cultivo estériles de 6 pocillos (*Costar Corning Incorporated*, EE.UU), dejándolos secar a 37°C hasta adherirse al plástico de cultivo. A continuación, se añadió medio de cultivo *Dulbecco's Modified Eagle's Medium*; (*DMEM*; Lonza, España) suplementado con 10% de suero bovino fetal (SBF; *Gibco-ThermoFisher Scientific*, España) y 1% de penicilina/estreptomicina (P/E; Gibco) (*DMEM* 10%), y las placas se incubaron a 37°C en una atmósfera húmeda al 5% de CO<sub>2</sub>. Cuando las células comenzaron a crecer a partir de los explantes, tras una semana en cultivo, se lavaron las placas con suero salino estéril (*Fresenius Kabi*, España) con el fin de eliminar las células no adherentes y los explantes sobrantes, y se añadió nuevo medio de cultivo *DMEM* 10%. El medio de cultivo se reemplazó cada 2-3 días.



**Figura 9.** Obtención de fibroblastos dermales mediante la técnica de cultivo por explantes de las biopsias de piel de 3 mm de diámetro obtenidas de las tres donantes. Escala 100 µm.

Cuando la confluencia celular del cultivo en monocapa fue aproximadamente del 90% se realizaron sucesivos subcultivos con el fin de incrementar el área de cultivo y el número de células para iniciar los experimentos. Para ello, se retiró el medio de cultivo, se lavaron las placas dos veces con suero salino y se incubaron a 37°C durante 2-3 min con tripsina-ácido etilen diamino tetracético (*Ethylene diamine tetraacetic acid*, *EDTA*) 0,25% (Gibco). Para comprobar que las células no seguían adheridas a la placa, éstas se visualizaron a través de un microscopio invertido IX51 (*Olympus* España SA, España). A continuación, se inactivó la tripsina con medio *DMEM* al 5% de SBF (*DMEM* 5%), se recogió la suspensión y se centrifugó durante 5 min a 1500 r.p.m.

El *pellet* de células obtenido se resuspendió en medio de cultivo *DMEM* 10% y se sembró en una mayor superficie para su expansión.

### **1.3. Caracterización de fibroblastos dermales obtenidos de biopsias de piel humana**

Las células obtenidas de biopsias de piel de las pacientes y la donante control se caracterizaron histológicamente antes de realizar el proceso de reprogramación celular.

Se estudió la expresión de marcadores característicos de fibroblastos utilizando el kit comercial *peroxidase/DAB ChemMate™ DAKO EnVision™ detection kit* (Dako, España), siguiendo las recomendaciones de la casa comercial. Para ello, se sembraron  $2 \times 10^4$  células/pocillo en *chamber-slides* de 8 pocillos (Merk, Alemania). Cuando la confluencia celular alcanzó el 80%, se fijaron las preparaciones con acetona (Panreac Química SA, España) durante 10 min a 4°C y se procedió inmediatamente a la realización del análisis histológico.

Los anticuerpos primarios utilizados fueron: colágeno tipo I (Col-1; ab90395, Abcam, Reino Unido), receptor 4 del factor de crecimiento ácido fibroblástico (*acidic fibroblast growth factor receptor 4, Fgfr4*; ab44971, Abcam) y vimentina (Vim; ab8069, Abcam). Las preparaciones se contratiñeron con hematoxilina-eosina (HE) y se observaron en un microscopio Olympus BX51M (Olympus Iberia SA, España) acoplado a una cámara digital Olympus DP70 (Olympus Iberia SA). Las imágenes fueron tomadas empleando el programa informático *CellSens Dimension* (Olympus Iberia SA).

## **2. Cultivo de células alimentadoras o células feeder**

Las células alimentadoras o *feeders* soportan el crecimiento y proliferación de las colonias de *iPSCs*, aportando diversas citoquinas y factores de crecimiento al medio de cultivo. Para el cultivo sobre células *feeder* de las *iPSCs* generadas en este estudio, se utilizó la línea celular de fibroblastos de prepucio humano (*human foreskin fibroblasts, HFF*; ref. CRL2429, ATCC, EEUU), previamente irradiada mediante radiación gamma, con el fin de inhibir su capacidad mitótica y conseguir así el aporte de factores de crecimiento al medio de cultivo sin que hubiese consumo del mismo.

## **2.1. Análisis de ciclo celular para el establecimiento de la dosis efectiva de radiación**

Con el fin de establecer la dosis de radiación efectiva para inhibir la capacidad mitótica de las células *HFF* se testaron varias dosis en la unidad de cobalto-60 del Servicio de Radiofísica del Centro Oncológico de Galicia (A Coruña) y posteriormente en un acelerador lineal *Varian Unique* del mismo Servicio.

La primera prueba se realizó en la unidad de cobalto-60, irradiando un tubo Falcon de 50 ml (*Corning Science*, México) con una densidad de  $1 \times 10^6$  células/40 ml a 70 y 100 Gy. Transcurridas 24 h, se analizó el ciclo celular por citometría de flujo utilizando yoduro de propidio (*propidium iodide*, *PI*). Para ello, se transfirieron  $2 \times 10^5$  células a tubos de poliestireno de fondo redondo (*Corning Science*). Las células se centrifugaron a 1500 r.p.m. durante 5 min y se lavaron dos veces con suero salino. A continuación, se eliminó el sobrenadante por decantación y se resuspendió el *pellet* de células en 350  $\mu$ l de la solución de *PI* y 1,5  $\mu$ l de *RNAse* (500  $\mu$ g/ml; Roche, España) en cada tubo. Los tubos se incubaron en oscuridad durante 15 min. Después de la incubación, éstos se centrifugaron a 1500 r.p.m. durante 5 min, el *pellet* celular se resuspendió en tampón *Fluorescence Activated Cell Sorting* (*FACS*, *Becton-Dickinson Biosciences*, España) en un volumen final de 200  $\mu$ l y se realizó el análisis con un citómetro de flujo *FACScalibur* (*Becton-Dickinson Biosciences*). Se realizó el mismo procedimiento con células *HFF* sin irradiar a modo de control del ciclo celular. El análisis se realizó utilizando el programa *Cell-Quest* (*Becton-Dickinson Biosciences*).

La segunda prueba se realizó en un acelerador lineal *Varian Unique*, irradiando un tubo Falcon de 50 ml con una densidad de  $1 \times 10^6$  células/40 ml a 75 Gy. Tras 24 h, se analizó el ciclo celular mediante citometría de flujo siguiendo el protocolo descrito anteriormente y comparando el ciclo celular con el de células *HFF* sin irradiar.

## **2.2. Congelación y almacenamiento de las células feeder**

Una vez determinada la dosis de radiación efectiva para inhibir la mitosis de las células *HFF*, éstas se subcultivaron siguiendo las recomendaciones de la casa comercial, con el fin de incrementar el área de cultivo y, así, el número de células disponibles. A continuación, las células *HFF* se irradiaron a 100 Gy en una unidad de cobalto-60 del Servicio de Radiofísica del Centro Oncológico de Galicia o a 75 Gy en un acelerador



lineal *Varian Unique* del mismo servicio.

Tras el proceso de irradiación, se procedió al recuento celular en una cámara de *Neubauer* (Alemania) empleando Azul Tripán (Sigma, EEUU) y se centrifugó la suspensión celular a 1500 r.p.m. durante 7 min. El *pellet* celular se resuspendió en medio de congelación a 4°C, compuesto por un 90% de SBF y un 10% de dimetilsulfóxido (DMSO; Sigma-Aldrich Química SA, España). El volumen de medio de congelación empleado se ajustó en función del recuento celular, con el fin de criopreservar  $2 \times 10^6$  células/ml. Los crioviales conteniendo 1 ml de la suspensión celular se almacenaron en nitrógeno líquido hasta su utilización, generando así un *stock* de células *feeder* necesario para la realización de la reprogramación celular y para los subcultivos de las colonias de *iPSCs*.

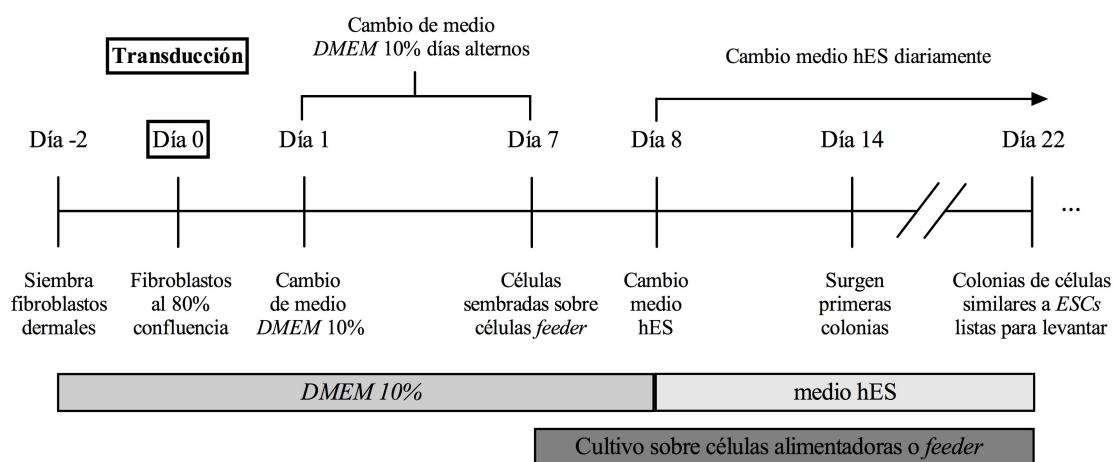
### **3. Reprogramación no integrativa de fibroblastos dermales para generar *iPSCs***

El proceso de reprogramación de los fibroblastos dermales de las tres donantes se llevó a cabo introduciendo los factores de reprogramación *Oct4*, *Sox2*, *Klf4* y *c-Myc* (*OSKM*) empleando como vector el virus Sendai. Para ello se utilizó el kit comercial *CytoTune-iPS Sendai reprogramming Kit* (Gibco-ThermoFisher Scientific), el cual emplea una forma no transmisible del virus Sendai para introducir de manera segura y expresar los factores necesarios para la reprogramación de células somáticas.

El esquema general del proceso desarrollado se representa en la figura 10. Dos días antes de la transducción (día -2), se sembraron  $5 \times 10^4$  fibroblastos dermales de cada donante, en el cuarto pase, en placas de cultivo estériles de 12 pocillos (*Costar Corning Incorporated*), con el fin de alcanzar un 80% de confluencia el día de la transducción (día 0). Los fibroblastos dermales se cultivaron en *DMEM* 10% durante 48 h. El día de la reprogramación se substituyó el medio de cultivo por nuevo *DMEM* 10% que contenía los vectores del kit *Cytotune* en una proporción 1:1:1:1. A continuación, las placas de cultivo se incubaron 24 h a 37°C en una atmósfera húmeda al 5% de CO<sub>2</sub>. Transcurrido este tiempo, el medio de cultivo se reemplazó por nuevo *DMEM* 10%, realizando cambios de medio en días alternos durante una semana. Siete días después, las células se lavaron dos veces con solución salina tamponada con fosfato (*phosphate buffered saline*, *PBS*; Dako, España) y se levantaron incubándolas con tripsina-EDTA 0,05% (*Gibco-ThermoFisher Scientific*) durante 2-3 min a 37°C. A continuación, se inactivó la tripsina con medio *DMEM* 5%, se recogió la suspensión celular y se centrifugó a 1500

r.p.m. durante 5 min para obtener un *pellet* de células. Éstas se resuspendieron en *DMEM* 10% y se sembraron sobre células alimentadoras o *feeders* en placas de cultivo estériles de 100 cm<sup>2</sup> (*Costar Corning Incorporated*, EEUU) en las que se había preparado previamente un revestimiento de Matrigel® (*Corning*, EEUU). Al día siguiente, el medio de cultivo se reemplazó por medio de células madre embrionarias humanas (medio hES) que contenía 80% de *DMEM-Knockout* sin L-glutamina, 20% de suero *knockout* (*knockout serum replacement*), 1% de aminoácidos no esenciales (*non-essential aminoacids*, *MEM-NEAA*), 1% de GlutaMAX™ 100X, 1% de P/E, β-mercaptoetanol al 0,1mM y 100 µg/ml de factor de crecimiento fibroblástico (*basic fibroblast growth factor*, *bFGF*) (todo de Gibco).

A partir de este momento, y debido a que la citoquina *bFGF* fundamental para mantener las colonias de *iPSCs* en un estado indiferenciado *in vitro* tiene una vida media de 24 h en cultivo, los cambios de medio se realizaron diariamente.



**Figura 10.** Esquema general del proceso desarrollado para realizar la reprogramación de los fibroblastos dermales obtenidos de las tres donantes.

#### 4. Cultivo y expansión de las *iPSCs* generadas

##### 4.1. Cultivo de las *iPSCs* sobre células alimentadoras o *feeders*

Las líneas de *iPSCs* se establecieron recogiendo manualmente las colonias que presentaban una morfología adecuada. Para llevar a cabo esta tarea, se acondicionó una campana de flujo laminar equipada con un estereomicroscopio SMZ-745T (Nikon, España), una cámara de fotomicrografía DS-FI2 (Nikon) a tiempo real y un monitor de control digital *Sight* DS-L3 (Nikon). Se seleccionaron entre 10 y 20 colonias de cada donante para expandir de manera clonal. Para ello, se recogieron trozos de cada una de

las colonias seleccionadas con una micropipeta “*stripper*” (*Origio MidAtlanticDevices*, Dinamarca) y sus puntas de capilar de 175  $\mu\text{m}$  (*Gynetics*, Bélgica) mientras se visualizaban en el monitor conectado al estereomicroscopio. Cada colonia se sembró de manera independiente, de manera clonal, en un pocillo de una placa estéril de 6 pocillos, realizando cambios del medio de cultivo diariamente. Las colonias se expandieron hasta obtener un número necesario para llevar a cabo el proceso de caracterización morfológica, fenotípica y molecular.

#### **4.2. Cultivo de las *iPSCs* libre de células alimentadoras o *feeders***

Para realizar ciertas pruebas del proceso de caracterización fenotípica y molecular, es necesario que las *iPSCs* se cultiven libres de células alimentadoras o *feeders*. Para ello, se precisan medios específicos que permitan a las células mantener su pluripotencia en ausencia de los estímulos y los factores liberados por las células alimentadoras.

Con el fin de adaptar las *iPSCs* generadas al cultivo libre de *feeders*, se testaron diferentes medios de cultivo, tanto comerciales como preparados en el laboratorio, en combinación con diferentes matrices y métodos de subcultivo:

- **Matriz de Matrigel® y medio de cultivo condicionado obtenido de células alimentadoras o *feeders*.** El medio de cultivo condicionado se preparó en el laboratorio, recogiendo el sobrenadante generado al cultivar la línea irradiada de fibroblastos *HFF* utilizada anteriormente como células alimentadoras o *feeders*. Estas células con la capacidad de división celular inhibida se sembraron en placas de cultivo adherentes de 100  $\text{cm}^2$  y se cultivaron en medio hES sin *bFGF*. El sobrenadante del medio de cultivo se recogió diariamente. Para utilizarlo como medio condicionado, el medio se filtró utilizando filtros estériles de 0,22  $\mu\text{m}$  de diámetro de poro y se le añadió *bFGF* en una concentración 1  $\mu\text{g/ml}$ .

Las colonias de *iPSCs* se levantaron con una micropeta “*stripper*” y se sembraron en placas de cultivo adherentes de 60  $\text{cm}^2$  (*Costar Corning Incorporated*) sobre las cuales se preparó con anterioridad un revestimiento de Matrigel®. Estas células se cultivaron en el medio condicionado preparado en el laboratorio, realizando cambios del mismo todos los días. El día del pase, el medio de cultivo condicionado fue suplementado con 1  $\mu\text{l/ml}$  del inhibidor de la apoptosis Y-27632 [*Rho-associated protein kinase (ROCK) Rock Inhibitor Y-27632; ReproCell, Reino Unido*].

- **Matriz de Matrigel® y medio de cultivo condicionado obtenido de fibroblastos embrionarios de ratón.** El medio de cultivo condicionado se obtuvo de recoger el sobrenadante generado al cultivar una línea de fibroblastos embrionarios de ratón [*mouse embryonic fibroblasts*, *MEF* (CF-1); *American Type Culture Collection* (ATCC® SCRC-1040™)].

Igual que sucedía con las células *feeder*, es imprescindible que se inhiba la capacidad mitótica de las células *MEF*, con el fin de que liberen factores de crecimiento al medio de cultivo, pero no lo consuman. Para ello, las células se expandieron en cultivo de acuerdo a las recomendaciones de la casa comercial y se irradiaron a 75 Gy en un acelerador lineal *Varian Unique* del Servicio de Radiofísica del Centro Oncológico de Galicia. Una vez irradiadas, se sembraron  $3 \times 10^6$  células en placas adherentes de 100 cm<sup>2</sup> y se cultivaron en medio hES sin *bFGF*. El sobrenadante del medio de cultivo se recogió diariamente. Para utilizarlo como medio condicionado, el medio se filtró utilizando filtros estériles de 0,22 µm de diámetro de poro (*Millipore*, Irlanda) y se le añadió *bFGF* en una concentración 1 µg/ml.

Las colonias de *iPSCs* se levantaron con una micropeta “*stripper*” y se sembraron en placas de cultivo adherentes de 100 cm<sup>2</sup> sobre las cuales se preparó con anterioridad un revestimiento de Matrigel®. Estas células se cultivaron en el medio condicionado preparado en el laboratorio, realizando cambios del mismo todos los días. El día del pase, el medio de cultivo condicionado fue suplementado con 1 µl/ml del inhibidor de la apoptosis *Rock Inhibitor Y-27632*.

- **Matriz de Matrigel® y medio de cultivo Essential 8.** Se utilizó el medio de cultivo comercial Essential 8 (*ThermoFisher Scientific*, España) siguiendo las recomendaciones de la casa comercial. Las colonias de *iPSCs* se levantaron con una micropipeta “*stripper*”, tal y como se describió anteriormente, y se sembraron en placas de cultivo adherentes de 60 cm<sup>2</sup> sobre las cuales se preparó con anterioridad un revestimiento de Matrigel®.

Los cambios de medio se realizaron diariamente. El día del pase, el medio de cultivo fue suplementado con 10 µl/ml de Revitacell™ 100X (*ThermoFisher Scientific*).

- **Matriz de vitronectina y medio de cultivo Essential 8.** Se utilizó una matriz de vitronectina [*vitronectin (VTN-N) recombinant human protein, truncated*;

*ThermoFisher Scientific*] en combinación con el medio de cultivo comercial Essential 8, siguiendo las recomendaciones del fabricante. Las colonias de *iPSCs* se levantaron con una micropipeta “*stripper*” y se sembraron en placas de cultivo adherentes de 60 cm<sup>2</sup> sobre las cuales se preparó con anterioridad el revestimiento de vitronectina.

Los cambios de medio se realizaron diariamente. El día del pase, el medio de cultivo fue suplementado con 10 µl/ml de Revitacell™ 100X (*ThermoFisher Scientific*).

- **Matriz de Geltrex® y medio de cultivo Essential 8.** Es este caso, la adaptación de las *iPSCs* al cultivo libre de células *feeder* consistió en levantar las células con una micropipeta “*stripper*” y sembrarlas en placas de cultivo adherentes de 60 cm<sup>2</sup> en las que previamente se había preparado un revestimiento de Geltrex® (Gibco) siguiendo las recomendaciones del fabricante. Las células se cultivaron en medio Essential 8 al que se le añadieron 10 µl/ml de Revitacell™ 100X el día del pase.
- **Matriz de Geltrex® y medio de cultivo StemFlex.** Se empleó una matriz de Geltrex® del mismo modo que en el apartado anterior, pero esta vez empleando el medio de cultivo comercial StemFlex (Gibco-*ThermoFisher Scientific*) de acuerdo a las recomendaciones del fabricante y realizando cambios de medio diariamente. El día del pase, el medio de cultivo fue suplementado con 10 µl/ml de Revitacell™ 100X.
- **Sistema de cultivo “*Defined Culture System*”.** El kit comercial *Cellartis® Defined Culture System*™ o DEF-CS™ (Takara Bio Europe, Suecia) está compuesto por un medio basal, tres factores de crecimiento denominados GF1, GF2 y GF3 y una matriz denominada COAT-1. Este sistema de cultivo se empleó siguiendo las instrucciones del fabricante. Brevemente, las células se cultivaron en medio basal suplementando con los factores de crecimiento GF1 y GF2. El día anterior al pase, se prepararon los pocillos de las placas que se iban a utilizar incubándolos a 37°C toda la noche con el volumen recomendado de COAT-1. El día del pase, se retiró el COAT-1 y se sembraron las células en medio basal suplementado con los factores GF1, GF2 y GF3. Tras el primer pase, los cambios de medio se realizaron diariamente, substituyendo el medio consumido por nuevo medio basal suplementado con los factores GF1 y GF2. El GF3 substituyó al suplemento con *Rock Inhibitor* Y-27632/Revitacell™ 100X.

- **Matriz de laminina recombinante humana 521 y medio de cultivo StemFlex.**  
Las células se levantaron con la micropipeta “*stripper*”, tal y como se describió anteriormente, y se sembraron en placas de cultivo adherentes de 60 cm<sup>2</sup> en las que previamente se había preparado un revestimiento de laminina recombinante humana 521 o laminina-521 (*recombinant human laminin-521*, Gibco-ThermoFisher Scientific) siguiendo las instrucciones del fabricante. Las células se cultivaron el medio de cultivo StemFlex realizando cambios de medio diariamente. El día del pase, el medio de cultivo fue suplementado con 10 µl/ml de Revitacell™ 100X.

En todos los casos las *iPSCs* se levantaron manualmente con la micropipeta “*stripper*” durante los dos/tres primeros pases. Con el fin de obtener un número de células suficiente para llevar a cabo los experimentos, a partir del segundo/tercer pase, las células se levantaron con Versene (*Versene Solution*; Gibco-ThermoFisher Scientific), una solución de *EDTA* suave para la disociación no enzimática de células.

Para ello, se retiró el medio de cultivo de las placas, se lavaron las células dos veces con *PBS* y se incubaron 3-5 min con Versene a 37°C y 5% de CO<sub>2</sub>. Cuando las colonias de células comenzaron a disgregarse, pero todavía permanecían adheridas al plástico de cultivo, se retiró la solución de Versene y se añadió el medio de cultivo correspondiente. El medio de cultivo se utilizó para lavar las placas y despegar los fragmentos de colonias de *iPSCs*. La suspensión celular se recogió en tubos Falcon de 15 ml (*Corning Science*) y se centrifugó a 1200 r.p.m durante 2 min. Los fragmentos de colonias de *iPSCs* se resuspendieron en el volumen apropiado de medio y se sembraron en una mayor superficie para su expansión.

En aquellos experimentos en los que era necesario realizar un conteo de las células, las colonias de *iPSCs* se levantaron con TrypLE™ 1X (*TrypLE™ Select Enzyme 1X, no phenol red*; Gibco-ThermoFisher Scientific) en dilución 1:10 en *PBS*. Para ello, se retiró el medio de cultivo de las placas, se lavaron las células dos veces con *PBS* y se incubaron 3-5 min con TrypLE™ 1X diluida a 37°C y 5% de CO<sub>2</sub>.

Para comprobar que las células no seguían adheridas a la placa, éstas fueron visualizadas a través de un microscopio invertido IX51. Se inactivó la TrypLE™ 1X diluida con el medio de cultivo correspondiente, se recogió la suspensión celular y se centrifugó durante 5 min a 1000 r.p.m. El *pellet* de células obtenido se resuspendió en el medio de cultivo correspondiente y se procedió al recuento celular con Azul Tripán.

## 5. Caracterización de las *iPSCs* generadas

En este estudio se validaron 2-4 clones de cada donante mediante la evaluación de la morfología de las colonias, presencia de actividad fosfatasa alcalina y perfil de expresión genético. Sólo un clon de cada donante se caracterizó en detalle, tal y como se describirá a continuación.

### 5.1. Estudio de la actividad fosfatasa alcalina

El estudio de la actividad fosfatasa alcalina se realizó empleando el kit comercial *alkaline phosphatase blue membrane substrate solution kit* (AB0300; Sigma-Aldrich Química SA) siguiendo las recomendaciones del fabricante. La actividad de esta enzima se analizó en las colonias de *iPSCs* que surgieron en las placas de cultivo de 100 cm<sup>2</sup> tras el proceso de reprogramación de los fibroblastos dermales de las tres donantes. La presencia de actividad fosfatasa alcalina se comprobó además en los clones de *iPSCs* de las tres donantes con más de 20 pases en cultivo sobre células *feeder*. Todas las muestras fueron observadas y fotografiadas en un estereomicroscopio Nikon SMZ745 acoplado a una cámara digital Slight DS-Fi2.

### 5.2. Análisis de expresión génica

#### 5.2.1. Extracción y cuantificación de ARN

Se recogieron 5x10<sup>5</sup> fibroblastos dermales de las tres donantes en el cuarto pase e *iPSCs* cultivadas sobre *feeders* en el octavo/décimo pase, y se almacenaron a -80 °C a modo de *pellet* seco hasta que se llevó a cabo el proceso de extracción de ARN. Además, se recogieron fibroblastos dermales de las tres donantes inmediatamente después del proceso de reprogramación para utilizar como control positivo de la expresión de genes del *SV*.

La extracción de ARN total se llevó a cabo utilizando el kit *RNeasy Mini Kit* (Qiagen, Holanda) siguiendo las recomendaciones de la casa comercial para la extracción de ARN de células animales. La cantidad y la calidad del ARN obtenido en cada caso se determinó mediante el espectrofotómetro *NanoDrop™ ND-1000* (*ThermoFisher Scientific*). Se midieron las absorbancias (Abs) a 280 nm, 260 nm y 230 nm para valorar la concentración de ARN (A260), la contaminación con proteínas (razón A260/A280) y la contaminación con sales y/o alcoholes (razón A260/A230).

### 5.2.2. Síntesis de ADN complementario

Una vez obtenido y analizado el ARN total, se realizó la retrotranscripción del ARN a ADN complementario (ADNc) en un termociclador (*GeneAmp PCRSystem 9700*; *Applied Biosystems*, España) con el kit *SuperScript® Vilo™ MasterMix* (Invitrogen), utilizando como cebadores *random hexamers* y siguiendo las recomendaciones de la casa comercial.

Las muestras de ADNc fueron almacenadas a -20°C hasta el momento de realización de los análisis de expresión génica mediante *PCR* cuantitativa en tiempo real (*quantitative Real Time PCR*, *qRT-PCR*).

### 5.2.3. PCR cuantitativa en tiempo real

El análisis de expresión génica mediante *qRT-PCR* se realizó cargando el ADNc en una placa de 96 pocillos (Roche, Alemania) junto con *LightCycler 480 Syber Green I Master* (Roche) y los cebadores específicos que se muestran en la tabla III (139).

**Tabla III.** Secuencias y características de los cebadores empleados en la *qRT-PCR* para la amplificación de genes específicos de células pluripotentes, de los factores de reprogramación endógenos y del virus Sendai (SV).

Gen	Especie	Cebador sentido (5'-3')	Cebador antisentido (5'-3')	Referencia <i>GeneBank</i>
<i>GAPDH</i>	Humano	gcaccgtcaaggctgagaac	agggatctcgtcctcgaa	NM_001289746.1
<i>CRIPTO</i>	Humano	cggaaactgtgagcacgatgt	gggcagccaagggtcatg	NM_003212.3
<i>NANOG</i>	Humano	acaactggccgaagaatag	gggtcccagtcgggttcac	XM_011520852.1
<i>OCT4</i> ENDO	Humano	ggaggaagctgacaacaatgaaa	ggcctgcacgagggttt	NM_004235.4
<i>SOX2</i> ENDO	Humano	tgcgagcgtgcacat	tcatgagcgtcttggtttc	NM_003106.3
<i>KLF4</i> ENDO	Humano	cgaaccacacaggtgaga	gagcggcggaatttccat	NM_004235.4
<i>CMYC</i> ENDO	Humano	agggtcaagttgacagtg	tggtgcatttcggtgttg	NC_000008.11
VIRUS SENDAI	SV	tggtgcatttcggtgttg	accagacaagagttaaga	Proporcionado con <i>Cytotune</i>
<i>OCT4</i> virus	SV	cccgaagagaaagcgaaccag	aatgtatcgaagggtctcaa	Proporcionado con <i>Cytotune</i>
<i>SOX2</i> virus	SV	atgcaccgctacgacgtgagcgc	aatgtatcgaagggtctcaa	Proporcionado con <i>Cytotune</i>
<i>KLF4</i> virus	SV	ttcctgcatgccagaggagccc	aatgtatcgaagggtctcaa	Proporcionado con <i>Cytotune</i>
<i>CMYC</i> virus	SV	taactgactagcaggctgtcg	tccacatacagtcctggatgatgatg	Proporcionado con <i>Cytotune</i>

La reacción de *PCR* consistió en 10 µl de Master Mix 2X, 0,25 µM de los cebadores sentido y antisentido, el ADNc y el agua hasta un volumen final de 20 µl.



Los experimentos se diseñaron de forma que cada muestra contase con una réplica técnica. Las reacciones de amplificación se realizaron de acuerdo a los siguientes parámetros: 95°C durante 10 s, 45 ciclos a 95°C durante 10 s, 60°C durante 5 s y 72 °C durante 10 s y un ciclo de enfriamiento de 20 s a 40°C. Después de la amplificación, se realizaron los análisis de las curvas de temperatura de fusión en tres pasos: 95°C durante 5 s, 65°C durante 60 s, 97°C durante 1 s y un enfriamiento final de la placa a 4°C.

Para analizar los niveles relativos de expresión (NRE) de los factores de reprogramación endógenos (*OCT4* ENDO, *SOX2* ENDO, *KLF4* ENDO y *CMYC* ENDO), los genes asociados a la pluripotencia (*CRIPTO* y *NANOG*) y comprobar el silenciamiento de los factores de reprogramación exógenos (*OCT4* virus, *SOX2* virus, *KLF4* virus y *CMYC* virus) y de los genes del virus Sendai (VIRUS SENDAI), se utilizó el gen gliceroaldehído 3-fosfato-deshidrogenasa (*glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase*, *GAPDH*) como gen constitutivo de referencia. Este gen se seleccionó después de haber realizado una validación de otros 9 genes candidatos [*Tyrosine 3-monooxygenase/tryptophan 5-monooxygenase activation protein*, *zeta polypeptide* (*YWHAZ*), *TATA box binding protein* (*TBP*),  $\beta$ -*Actin*, *Ribosomal protein, large*, *P0* (*RPLP0*), *Glucuronidase- $\beta$*  (*GUSB*), *Ribosomal protein, large*, *P13* (*RPLP13*), *18S ribosomal RNA* (*RRNA18S*), *Beta-2-Microglobulin* (*B2M*) e *Hydroxymethylbilane Synthase* (*HMBS*)] utilizando el algoritmo estadístico geNorm (140), el cual realiza una evaluación de la estabilidad en la expresión de los genes seleccionados.

Los resultados se analizaron con *LightCycler 480 Software release 1.5.0. SP4*. Para calcular los NRE de dichos genes estudiados, los valores obtenidos se normalizaron con respecto al gen de referencia *GAPDH* utilizando el método  $2^{-\Delta\Delta C_t}$  (141).

### **5.3. Estudio de la capacidad de diferenciación *in vitro* de las *iPSCs* hacia las tres capas germinales: endodermo, ectodermo y mesodermo**

Para estudiar la capacidad de diferenciación de las *iPSCs* generadas hacia endodermo, mesodermo y ectodermo se realizó la técnica de formación de cuerpos embrionarios o *EBs*, la cual consiste en la formación de agrupaciones tridimensionales de células o agregados en los que se estimula la diferenciación hacia cada uno de los linajes cultivándolos en medios de diferenciación específicos.

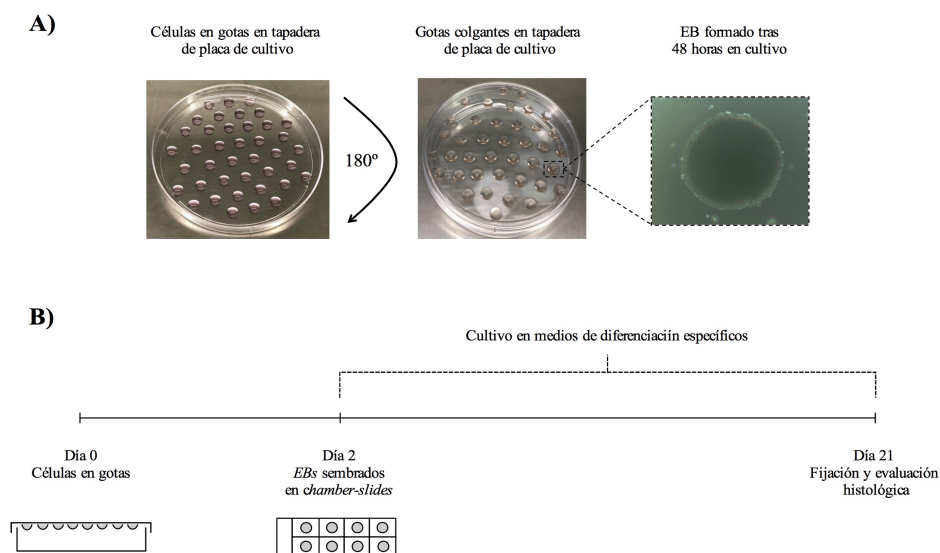
Para formar los *EBs* se utilizó la técnica de la gota colgante o “*hanging-drop*”. El esquema general de este protocolo se representa en la figura 11. Las *iPSCs* cultivadas en ausencia de células alimentadoras o *feeders* (sistema de cultivo *DEF-CS* o matriz de lamina-521 y medio de cultivo StemFlex) se levantaron con TrypLE™ 1X tal y como se describe en el apartado 4.1., y se resuspendieron en medio hES sin la citoquina *bFGF*. Tras el recuento del número de células, se formaron gotas de 25 µl con la suspensión celular en las tapaderas de placas de cultivo no adherentes de 100 cm<sup>2</sup> (2x10<sup>4</sup> células/gota) las cuales contenían 10 ml de *PBS* para evitar la deshidratación de las gotas. A continuación, las placas se voltearon 180° y se incubaron durante 24-48 h a 37°C y en una atmósfera al 5% CO<sub>2</sub>. Durante este tiempo, las células se acumulan en el extremo de las gotas por acción de la gravedad, interactuando entre sí y formando las estructuras tridimensionales denominadas *EBs* (Figura 11A). Entre 24-48 h después, los *EBs* formados se recogieron y se sembraron en pocillos independientes en *chamber-slides* de 8 pocillos (Figura 11B).

Para la diferenciación hacia endodermo las *chamber-slides* se prepararon con un revestimiento de 0,1% de gelatina y se cultivaron los *EBs* durante tres semanas en medio de diferenciación específico (80% *DMEM Knockout* sin L-glutamina, 20% SBF, 1% *MEM-NEAA*, 1% GlutaMAX™ 100X, 1% P/E y β-mercaptoetanol al 0,1mM) (medio EB).

Para estimular la diferenciación hacia mesodermo, los *EBs* se mantuvieron en el mismo medio de diferenciación, pero suplementado con ácido ascórbico 100 µM (Sigma-Aldrich Química SA).

Para estimular la diferenciación hacia ectodermo, los *EBs* se transfirieron a *chamber-slides* con revestimiento de Matrigel® y se cultivaron en medio de diferenciación específico: *DMEM F-12*, 1% P/E, 1% GlutaMAX™ 100X, 0,5% suplemento N2 (Gibco) y 1% suplemento B27 (Gibco).

En todos los casos el medio se cambió en días alternos durante tres semanas. Transcurrido este tiempo, las células se fijaron con paraformaldhído al 4% durante 10 min a temperatura ambiente y se almacenaron en *PBS* a 4°C hasta que se realizó la técnica de inmunofluorescencia.



**Figura 11. (A)** Esquema de formación de cuerpos embrionarios (*EBs*) mediante el protocolo de diferenciación de gota colgante. **(B)** Flujo de trabajo desarrollado para estudiar la capacidad de diferenciación de las *iPSCs* hacia los linajes embrionarios.

#### 5.4. Análisis inmunohistoquímico de las *iPSCs* generadas

##### 5.4.1. Estudio de marcadores de pluripotencia en las colonias de *iPSCs*

Mediante técnicas de inmunofluorescencia se estudió si las *iPSCs* generadas expresaban marcadores de pluripotencia, tales como la proteína de superficie *TRA-1-81* y la proteína intercelular *NANOG*. Ambos anticuerpos fueron previamente titulados empleando como control positivo la línea celular de hepatocarcinoma HepG2, cedida por el grupo de Oncología del INIBIC.

Para llevar a cabo el estudio de estos marcadores, se sembraron *iPSCs* sobre una capa de células *feeder* en *chamber-slides* de 8 pocillos. Cuando surgieron las colonias de *iPSCs*, éstas se fijaron durante 10 min a temperatura ambiente con paraformaldehído al 4% (Sigma-Aldrich Química SA) y se lavaron dos veces con *PBS*. En el caso del marcador intercelular *NANOG*, las células se permeabilizaron con Triton-X-100 al 0,1% (Sigma-Aldrich Química SA) en *PBS* a temperatura ambiente durante 10 min. A continuación, en ambos casos se bloquearon las preparaciones con la solución de bloqueo que contenía glicina 0,1M (Sigma-Aldrich Química SA), 2% de albúmina sérica bovina (*bovine serum albumin*, *BSA*; Sigma-Aldrich Química SA) y Triton-X-100 al 0,1% en *PBS* 0,01M pH 7,4 durante 15 min. Los anticuerpos primarios diluidos en la solución de bloqueo se incubaron durante toda la noche a 4°C. Transcurrida la incubación con los anticuerpos primarios, las células se lavaron con *PBS* y se incubaron

en oscuridad durante una hora con los anticuerpos secundarios correspondientes diluidos en la solución de bloqueo. Las preparaciones se lavaron nuevamente con *PBS*, se contratiñeron con el marcador nuclear 4',6-diamino-2-fenilindol (*4',6-diamidino-2-phenylindole*, *DAPI*; Sigma-Aldrich Química SA) y se montaron con medio de montaje para inmunofluorescencias (*Fluorescence Mounting Medium*, Dako). Las muestras se visualizaron en un microscopio Olympus BX61 (Olympus España SA) equipado con una cámara digital Olympus DP70 (Olympus España SA).

Los anticuerpos primarios utilizados fueron *NANOG* (ab109250, Abcam. 1:100) y *Tra-1-81* (ab16289, Abcam. 1:100). Los anticuerpos secundarios utilizados fueron cabra anti-conejo marcado con *PE* (sc-3739, SantaCruz, EEUU 1:200) y conejo anti-ratón marcado con *FITC* (F0313, Dako. 1:200).

#### **5.4.2. Estudio de marcadores característicos de las capas germinales en las *iPSCs* diferenciadas *in vitro***

Para comprobar que las *iPSCs* que crecieron a partir de los *EBs* se habían diferenciado correctamente *in vitro*, se estudió mediante inmunofluorescencia la presencia de marcadores característicos de cada uno de los linajes: alfa-fetoproteína o AFP (endodermo), alfa-actina del músculo liso o SMA (mesodermo) y beta-tubulina III o TUJ1 (ectodermo). Para ello, se siguió el protocolo descrito en el apartado anterior. Los anticuerpos utilizados fueron: *alpha-fetoprotein* (ab 133617, Abcam), *alpha-smooth muscle actin* (ab 7817, Abcam) y *neuron-specific class III beta-tubulin* (T8660, Sigma). Los anticuerpos secundarios empleados fueron *goat anti-rabbit-PE* (sc-3739, SantaCruz) y *rabbit anti-mouse-FITC* (F0313, Dako). Las preparaciones fueron contrateñidas con *DAPI* y se visualizaron en un microscopio confocal A1R (Nikon) del Servicio de Apoyo a la Investigación (SAI) de la Universidade da Coruña.

#### **5.5. Análisis del cariotipo**

Con el fin de comprobar que el proceso de reprogramación y el cultivo de las *iPSCs* no produjo alteraciones cromosómicas en las células, se estudió el cariotipo de los fibroblastos de las tres donantes en pase cinco y de los tres clones de *iPSCs* seleccionados tras el proceso de caracterización con más de 20 pases en cultivo libre de células *feeder*. Para ello, se utilizó el servicio de cariotipado KaryoStat™ (KaryoStat™ service, ThermoFisher Scientific).

### 5.6. Comprobación de la autenticidad de las líneas de *iPSCs* generadas

Para confirmar que las líneas de *iPSCs* establecidas procedían de los fibroblastos dermales de cada donante (identidad de las líneas) se llevó a cabo un análisis de *STRs*. El ADN genómico se extrajo a partir de  $5 \times 10^5$  *iPSCs* en cultivo libre de células *feeder* y de  $5 \times 10^5$  fibroblastos dermales de cada donante en el cuarto pase utilizando el kit de extracción *DNeasy Blood and Tissue Kit* (Qiagen) siguiendo las recomendaciones del fabricante. El principio de extracción de este kit se basa en la unión específica del ADN a una membrana de sílica gel inmovilizada en una columna, mientras el resto de los contaminantes (cationes divalentes y proteínas) pasan a través de la misma tras dos pasos sucesivos con soluciones de lavado. Finalmente, el ADN purificado se separa y se eluye de la membrana tras un tercer lavado con una solución de elución.

La cantidad y la calidad del ADN obtenido en cada caso se determinó mediante el espectrofotómetro *NanoDrop™ ND-1000*. Las alícuotas de ADN obtenidas y cuantificadas tras el procedimiento descrito se enviaron al servicio de genómica del Instituto de Investigación Biomédica “Alberto Sols” (Madrid) para el análisis de los siguientes *STRs*: D5S818, D13S317, D7S820, D16S539, VWA, TH01, AMELOGENINA, TPOX, CSF y D21S11.

### 6. Estudio de polimorfismos de un solo nucleótido asociados a la artrosis de manos

En este trabajo se estudiaron los siguientes *SNPs* (Tabla IV): rs716508 del gen *ataxin 2-Binding Protein 1 (A2BP1)*, rs3204689 del gen *Aldehyde Dehydrogenase 1 Family Member A2 (ALDH1A2)*, rs143383 del gen *Growth Differentiation Factor 5 (GDF5)*, rs1799724 del gen *Tumor Necrosis Factor alpha (TNF-alpha)*, rs12901499 del gen *SMAD Family Member 3 (SMAD3)*, rs1805013 y rs1805015 del gen *Interleukin 4 Receptor (IL-4R)*, rs2287047 del gen *Interleukin 1 Receptor 1 (IL1-R1)*, rs1940475 del gen *Matrix Metalloproteinase 8 (MMP8)* y rs77245812 del gen *Matrilin 3 (MATN3)*, tanto en los fibroblastos dermales de las donantes antes de reprogramar como en las tres líneas de *iPSCs* generadas.

#### 6.1. Extracción de ADN y amplificación mediante *PCR*

Para llevar a cabo el estudio de los *SNPs* mencionados con anterioridad, fue necesario realizar una extracción de ADN a partir de *pellets* de  $5 \times 10^5$  fibroblastos dermales en el sexto pase y a partir de *pellets* de  $5 \times 10^5$  *iPSCs* en pase 10-15 en cultivo libre de células

*feeder*, siguiendo el procedimiento descrito en el apartado 5.6 de material y métodos.

Una vez extraído el ADN se procedió a la amplificación de las regiones de interés que contenían el *SNP*. Para ello, se llevó a cabo una *PCR* convencional empleando el kit comercial *BIOTAQ™ PCR Kit* (Bioline, Reino Unido) y los cebadores recogidos en la tabla IV.

**Tabla IV.** Secuencias y características de los cebadores empleados para evaluar la presencia de los *SNPs* seleccionados.

Gen	SNP	Cebador sentido (5'-3')	Cebador antisentido (5'-3')	Tamaño amplicón
<i>A2BP1</i>	rs716508	caggatactgcacaggctca	taccagcccaactcaaat	339 pb
<i>ALDH1A2</i>	rs3204689	ctctccaaggagatgtcagc	acacacacaccccaaaactg	332 pb
<i>GDF5</i>	rs143383	caggcctgtgagtgtgtg	cagcagtagcagcagaagga	376 pb
<i>TNF-alpha</i>	rs1799724	ggggaagcaaaggagaagct	tcactttctccctaagctcct	378 pb
<i>SMAD3</i>	rs12901499	ttaaagcaggggagtgccac	aagcacaggcccccataa	368 pb
<i>IL-4R</i>	rs1805013	cagagagcctgttctggac	agggcatctcgggttctact	377 pb
<i>IL-4R</i>	rs1805015	cagagagcctgttctggac	agggcatctcgggttctact	377 pb
<i>IL1-R1</i>	rs2287047	accagcctccagagaagaaa	gtgcatagtctgactttggatgt	411 pb
<i>MMP8</i>	rs1940475	acactcttcaaaggcaggga	acagcaagaccctatgtgc	406 pb
<i>MATN3</i>	rs4747096	aaggagcccagagagcaatg	tcactttctccctaagctcct	398 pb

La reacción de amplificación se realizó a un volumen final de 25 µl para cada una de las muestras, tras añadir 2,5 µl de *Reaction Buffer*, 0,5 µl de MgCl<sub>2</sub>, 0,2 µl de una mezcla de desoxinucleósidos trifosfato (*deoxynucleotide triphosphate, dNTPs*), 0,15 µl de ADN polimerasa *BioTaq*, 0,3 µl de los cebadores sentido y antisentido, 19,35 µl de agua Milli-Q autoclavada libre de *DNasas* (Merk Millipore) y 1,5 µl de ADN.

El programa empleado para la amplificación fue el siguiente: un ciclo de desnaturalización inicial de 94°C durante 5 min; 40 ciclos de amplificación con una desnaturalización a 94° durante 30 s, una hibridación a 58°C durante 30 s y una elongación a 72°C durante 30 s y un ciclo final de extensión de 72°C durante 7 min. La *PCR* se llevó a cabo en un termociclador *Veriti 96- Well Thermal Cycler* (*Applied Biosystems*, EEUU). Para todas las reacciones de *PCR* se utilizaron controles negativos sin ADN, con el fin de comprobar las posibles contaminaciones externas.

Tras la *PCR*, se realizó una electroforesis en gel de agarosa de los productos de amplificación obtenidos, con el fin de testar que el ADN resultante de la amplificación se correspondía con el tamaño de amplicón esperado para cada uno de los fragmentos

estudiados. La electroforesis se realizó en un gel de agarosa al 1,5% teñido con 1 µl de *SYBR Safe DNA Gel Stain* (LifeTechnologies, EEUU). Las muestras fueron mezcladas con un tampón de carga con azul de xianol, azul de bromofenol y glicerol en relación 1:10 y se dejaron correr a 90 mV durante una hora. Como marcador de peso molecular, se empleó el *DNA Molecular Weight Marker XIV* (Roche Applied Science, Alemania).

Para la visualización de las bandas del gel se empleó el transiluminador *Fujifilm Luminescent Image Analyzer LAS 3000* (Fujifilm, Japón) y el programa informático asociado *LAS3000 Image Reader* (Fujifilm, Japón).

## **6.2. Purificación de los productos de *PCR* y secuenciación Sanger**

Tras la realización de la *PCR* y la comprobación de la correcta amplificación de los genes de interés por medio de una electroforesis en gel de agarosa, se realizó una purificación de los productos de *PCR* obtenidos con el fin de eliminar posibles contaminantes (cebadores y *dNTPs* no incorporados durante la *PCR*) que podrían interferir en la técnica de secuenciación, empleando el *ExoSap-IT* (ThermoFisher Scientific) de acuerdo a las instrucciones del fabricante. Este método se basa en el uso simultáneo de dos enzimas hidrolíticas, una exonucleasa I (Exo-I) y una fosfatasa alcalina de camarón (*Shrimp Alkaline Phosphatase*, *SAP*) que eliminan residuos de ADN monocatenarios (restos de cebadores) y *dNTPs* no incorporados respectivamente.

Una vez purificados los productos obtenidos de la *PCR* se realizó la reacción de secuenciación mediante el kit comercial *BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit* (Applied Biosystem), siguiendo las recomendaciones del fabricante en un termociclador *Veriti 96- Well Thermal Cycler*. A continuación, el producto de secuenciación fue purificado empleando el kit *Montage SEQ<sub>96</sub> Sequencing Reaction Cleanup Kit* (Merk Millipore) y se cargó un secuenciador automático de ADN de tecnología capilar *ABI 3130 XL* (Applied Biosystems). Finalmente, las secuencias obtenidas se analizaron mediante el programa informático *Sequencing Analysis Software 6 v6.0* (Applied Biosystems).

## **7. Diferenciación condrogénica *in vitro* de las *iPSCs* generadas a través del estadio de *MSCs***

La estrategia que se siguió en este estudio para diferenciar las *iPSCs* hacia condrocitos fue, en primer lugar, estimular la diferenciación de las *iPSCs* hacia células similares a

---

*MSCs* y, en segundo lugar, estimular la diferenciación de las mismas hacia condrocitos.

Además, con la finalidad de determinar que la diferenciación de las *iPSCs* hacia similares a *MSCs* se había realizado con éxito, se caracterizó la población celular obtenida mediante citometría de flujo y análisis histológico de la diferenciación trilineal, de acuerdo con las recomendaciones de la Sociedad Internacional de Terapia Celular (107).

### **7.1. Diferenciación *in vitro* de las *iPSCs* hacia células similares a *MSCs***

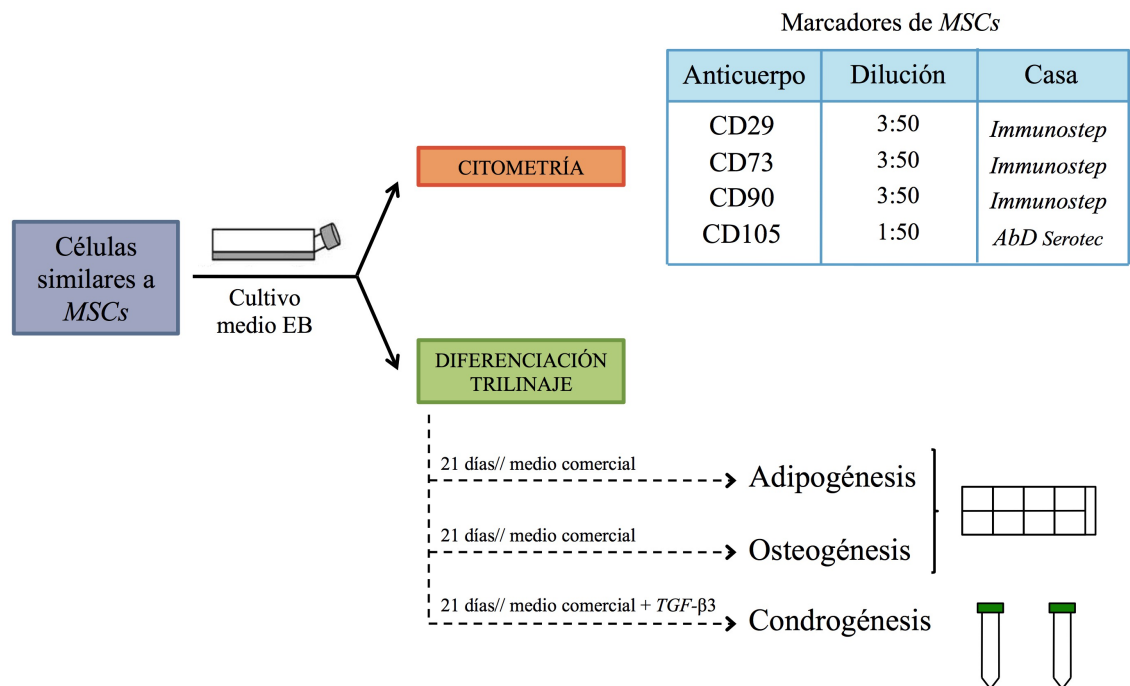
Para estimular la diferenciación de las líneas de *iPSCs* NFiPS 15/637#7 y MOAFiPS 15/645#7 hacia células similares a *MSCs* se siguió un protocolo descrito previamente (111, 112) con algunas modificaciones.

Este protocolo consistió en la formación de *EBs*, tal y como se describió en el apartado 5.3 de material y métodos. Dichos *EBs* se pasaron, en grupos de 5, a pocillos independientes de placas de 6 pocillos en los que previamente se había preparado un revestimiento de gelatina al 0,1%. Los *EBs* se cultivaron en medio EB durante 10 días, realizando cambios de medio cada 2-3 días, momento en el cual las células que habían ido saliendo de manera espontánea desde los *EBs* y que permanecían adheridas al plástico de cultivo estuvieron confluentes. Transcurrido este tiempo, las células se lavaron dos veces con *PBS* y se incubaron con tripsina-*EDTA* al 0,05% en una estufa a 37°C y al 5% de CO<sub>2</sub> durante 2-3 min. A continuación, se comprobó que las células no seguían adheridas a la placa y se inactivó la tripsina-*EDTA* al 0,05% con medio *DMEM* 5%. La suspensión celular se centrifugó a 1000 r.p.m durante 5 min, se retiró el sobrenadante con ayuda de una micropipeta y se resuspendió el *pellet* celular en medio EB. La suspensión celular se sembró en una mayor superficie para su expansión. Este proceso se repitió sucesivas veces con el fin de homogenizar la población celular.

### **7.2. Caracterización de las células similares a *MSCs* generadas**

Una vez que se obtuvo un número suficiente de células de aspecto homogéneo (aproximadamente en el subcultivo 6), se estudió mediante citometría de flujo la presencia de marcadores de superficie característicos de *MSCs*. Además, se evaluó la capacidad de diferenciación trilineal de las células mediante su cultivo durante 21 días en medios de diferenciación específicos (Figura 12).





**Figura 12.** Esquema general en el que se representa el proceso de caracterización de las células similares a MSCs obtenidas a partir de las líneas de iPSCs NFiPS 15/637#7 y MOAFiPS 15/645#7.

**7.2.1. Estudio de marcadores de superficie característicos de MSCs mediante citometría de flujo**

Para realizar el análisis de la expresión de los marcadores de superficie celular se analizaron las células similares a MSCs obtenidas de las dos líneas de iPSCs en un citómetro de flujo FACScalibur (*Becton-Dickinson Biosciences*, España).

Se emplearon, para ello, anticuerpos para los siguientes marcadores: CD29 [clon VJ1/14 (3:50), *Immunostep* SL, España], CD73 [clon AD2 (3:50) *Immunostep* SL], CD90 [clon 5E10 (1:50) *Immunostep* SL] y CD105 [clon SN6 (1:50), *AbD Serotec*, *Bio-Rad Laboratories*, SA, España].

Tras su tripsinización y posterior conteo con Azul Tripán, se fijaron  $10^5$  células en tubos de citometría con paraformaldehído al 1% durante 10 min a temperatura ambiente y, a continuación, se lavaron con tampón de citometría de flujo [PBS pH 7,2, BSA 0,5%, EDTA 2mM (Sigma)]. Los tubos se centrifugaron a 1500 r.p.m. 5 min, se eliminó el sobrenadante y se homogeneizó la suspensión celular en un agitador. A continuación, las células se bloquearon incubándolas durante 30 min a 4°C en tampón de citometría de flujo. Se procedió a realizar la incubación de los anticuerpos primarios diluidos en

tampón de citometría de flujo y se incubaron durante 40 min a 4°C en oscuridad. Tras esta incubación, se realizaron dos lavados con tampón de citometría de flujo junto con dos centrifugaciones a 1500 r.p.m. 5 min. Las células se mantuvieron en oscuridad a 4°C hasta su análisis.

El análisis se realizó utilizando el programa *Cell-Quest*, con el cual se determinó el porcentaje de positividad para cada uno de los marcadores.

### **7.2.2. Diferenciación adipogénica *in vitro***

Para analizar la capacidad de diferenciación adipogénica, las células similares a *MSCs* se sembraron en cuatro pocillos de una *chamber-slide* de 8 pocillos en una densidad de  $2 \times 10^4$  células/pocillo: tres de esos pocillos fueron utilizados para la diferenciación adipogénica y el cuarto pocillo se utilizó a modo de control negativo de la diferenciación, cultivando las células sólo con medio EB.

Durante 21 días se trataron las células a diferenciar con *StemPro® Adipogenesis Differentiation Kit* (Gibco-ThermoFisher Scientific) siguiendo las recomendaciones de la casa comercial y realizando cambios de medio cada 3 días. Transcurridos 21 días, se eliminó el medio de la *chamber-slide*. Los pocillos de la misma fueron lavados con *PBS* y las células fueron fijadas con paraformaldehído al 4% para su posterior tinción.

Para llevar a cabo el análisis citológico de la diferenciación adipogénica se realizó una tinción *Oil-Red-O* (Sigma Aldrich Química SA) sobre las células de la *chamber-slide*. Esta tinción permite valorar la presencia de vacuolas lipídicas propias de la diferenciación adipogénica, observándose coloración rojo-naranja en presencia de las mismas. El protocolo de esta tinción es el siguiente:

Tras haber fijado las células con paraformaldehído al 4%, éstas se lavaron con alcohol isopropílico (Panreac Química SA) al 60%. Se añadió la solución de *Oil-Red-O* previamente filtrada y se dejó actuar durante 20 min a temperatura ambiente. A continuación, se lavaron las preparaciones con alcohol isopropílico al 60% seguido de un lavado con agua destilada. Finalmente, se retiró el agua y se realizó una contratinción con hematoxilina de Gill (Merck) durante 3 min. Pasado el tiempo, se lavaron las preparaciones durante 10 min en agua destilada y finalmente se montaron con *Glycergel* (Dako).

Las preparaciones se observaron en un microscopio Olympus BX61 equipado con una cámara digital Olympus DP70. Las imágenes fueron tomadas empleando el programa *CellSens Dimension* (Olympus Iberia SA). Los análisis cuantitativos de la tinción *Oil-Red-O* se realizaron utilizando el programa informático ImageJ 1.48v (*National Institutes of Health*, EEUU). Tras realizar la sustracción de color de las regiones no teñidas y las regiones contrateñidas, el porcentaje de área teñida se midió y expresó como media  $\pm$  desviación estándar.

### **7.2.3. Diferenciación osteogénica *in vitro***

Para analizar la capacidad de diferenciación osteogénica, las células similares a *MSCs* se sembraron en cuatro pocillos de una *chamber-slide* en una densidad de  $2 \times 10^4$  células/pocillo. Tres de esos pocillos fueron utilizados para la diferenciación osteogénica y el pocillo restante se utilizó a modo de control negativo de la diferenciación, cultivando las células sólo con medio EB.

Las células a estimular se trataron con el medio de diferenciación osteogénico comercial *StemPro® Osteogenesis Differentiation Kit* (Gibco-ThermoFisher Scientific), realizando cambios de medio cada 3 días. Los controles negativos de la diferenciación se mantuvieron con medio de cultivo EB.

Tras 21 días de cultivo se fijaron las células de la *chamber-slide* tal y como se describió anteriormente en el apartado 7.2.2 de material y métodos para su posterior tinción.

Para llevar a cabo el análisis citológico de la diferenciación osteogénica se realizó una tinción Rojo Alizarina (Merck). Esta tinción permite valorar la presencia de depósitos de calcio extracelulares característicos de la diferenciación osteogénica. El protocolo de esta tinción es el siguiente:

Una vez fijadas, se lavaron los pocillos de las *chamber-slides* dos veces con *PBS*. A continuación, se retiró el *PBS* y se añadió Rojo Alizarina al 1% en hidróxido de potasio (KOH; Merck) previamente filtrado, el cual se dejó actuar durante 5 min a temperatura ambiente. Finalmente, las preparaciones se montaron con *Glycergel* y se observaron en un microscopio Olympus BX61 equipado con una cámara digital Olympus DP70. Las imágenes se tomaron empleando el programa *CellSens Dimension*.

Los análisis cuantitativos de la tinción Rojo Alizarina se realizaron utilizando el programa informático ImageJ 1.48v. Tras realizar la sustracción de color de las regiones

no teñidas y las regiones contrateñidas, el porcentaje de área teñida se midió y expresó como media  $\pm$  desviación estándar.

### **7.3. Diferenciación *in vitro* de las células similares a MSCs hacia condrocitos**

Para testar la diferenciación condrogénica se utilizó la técnica de formación de micromasas (Johnstone *et al.*, 1998). Para ello, se recogieron  $25 \times 10^4$  células, se depositaron en tubos de propileno no adherentes (J.C. Catalán S.L., España) y se centrifugaron a 1500 r.p.m. durante 5 min. La formación de este *pellet* tridimensional facilita la comunicación celular, y por tanto, la formación de MEC bajo el estímulo adecuado.

Se cultivaron dos réplicas para la estimulación condrogénica y una réplica como control negativo de diferenciación en medio EB. El medio de estimulación condrogénico utilizado fue el *StemPro Chondrogenesis Differentiation Kit* (Gibco-ThermoFisher Scientific) suplementado con 10 ng/ml de TGF- $\beta$ 3 (*ProSpec-Tany Technogene Ltd.*, Israel). A las réplicas control negativo de diferenciación se les añadió medio EB.

Las micromasas se mantuvieron en cultivo durante 21 días, reemplazándose el medio cada 3 días. Una vez transcurrido este tiempo, las micromasas se deshidrataron, se incluyeron en parafina y se cortaron en el microtomo para su posterior análisis histológico.

Las secciones de las micromasas se procesaron para las siguientes tinciones histológicas:

- Hematoxilina-Eosina (HE), para una valoración general de la morfología celular. Tiñe en color azul/violeta las estructuras ácidas (como el núcleo celular) y en color rosa las estructuras básicas (como la matriz y el citoplasma celular). El protocolo de la tinción HE que se siguió fue el siguiente: Las preparaciones se introdujeron en hematoxilina de Harris (Panreac Química SA) durante 5 min y se lavaron con agua destilada también durante 5 min. Posteriormente, se hizo virar el color en agua del grifo templada. A continuación, se introdujeron los cortes en la eosina (Merck) durante 1 min. Se siguió con una deshidratación, mediante pases por un gradiente creciente de alcoholes (de 96° y de 100°), para terminar en xilol. Finalmente, se montaron los cortes con *DePeX* (BHD VWR International LTD, Inglaterra).

- Tricrómico de Masson (TM), para una valoración del aspecto general de la micromasa. Tiñe los citoplasmas celulares de color rosa, los núcleos celulares en color azul/violeta y revela además la presencia de Col en color azul. El protocolo de la tinción TM que se siguió fue el siguiente: Una vez realizada la hidratación de los cortes en parafina, se introdujeron en alumbre férreo (Merck) 30 min a temperatura ambiente. A continuación, se lavaron dos veces en agua corriente del grifo. Posteriormente, se sumergieron los cortes en hematoxilina férrea de Weigert (Fluka, España) 10 min. Transcurrido este tiempo, se lavaron en agua del grifo (2 lavados), para continuar con alcohol-ácido pícrico (Panreac Química S.A.) durante 6 min. Se lavaron en agua corriente nuevamente y se introdujeron los cortes en fucsina de Ponceau (Merck) 8 min, seguido de ácido fosfomolibdínico I (VWR Prolabo, Francia) durante 5 min y ácido fosfomolibdínico II (VWR Prolabo) durante 5 min. Se prosiguió con azul de anilina (Merck) durante 12 min, que se lavó con agua destilada. Se deshidrataron los cortes haciendo pases en una batería de alcoholes crecientes para deshidratar, terminando en xilol y finalmente se montaron las preparaciones con *DePeX*.
- Safranina O (SO). Revela la presencia de PG, tiñéndolos en color anaranjado debido a la metacromasia que se produce. El protocolo de la tinción SO que se siguió fue el siguiente: Se introdujeron los porta-objetos con los cortes ya hidratados en hematoxilina férrea de Weigert durante 7 min. Se lavaron con agua destilada y se sumergieron en la SO durante 15 min. A continuación, se sumergieron en agua destilada y se deshidrataron con alcohol de 96°, alcohol de 100° y xilol. Finalmente las preparaciones se montaron con *DePeX*.

Las tinciones realizadas se observaron en un microscopio Olympus BX61 equipado con una cámara digital Olympus DP70.



### **III. MATERIAL Y MÉTODOS DEL OBJETIVO 2**





El segundo objetivo del presente estudio se desarrolló durante una estancia predoctoral de 3 meses de duración en la Universidad de Gotemburgo, Suecia. El trabajo realizado durante esta estancia y recogido en la presente memoria estuvo supervisado y dirigido por el profesor Anders Lindahl y la profesora Stina Simonsson, del *Department of Clinical Chemistry and Transfusion Medicine* del *Institute of Biomedicine, Sahlgrenska University Hospital*.

### **1. Línea de iPSCs A2B**

Se utilizó la línea de iPSCs A2B previamente generada por el grupo de investigación *Molecular and Cellular Biology* del *Department of Clinical Chemistry and Transfusion Medicine* del *Institute of Biomedicine, Sahlgrenska University Hospital*. Esta línea de iPSCs fue obtenida a partir de condrocitos de una paciente sometida a la técnica del implante autólogo de condrocitos o *ACI (autologous chondrocyte implantation)*. Para la generación de la línea los autores emplearon un sistema no integrativo basado en la utilización de vectores sintéticos de ARN mensajero (*Stemgent mRNA Reprogramming Kit*, Stemgent, EEUU). La línea A2B fue previamente caracterizada para comprobar que no presentaba alteraciones en el genoma mediante un *array* de SNPs (*whole-genome single nucleotide polymorphism array analysis*) y cariotipado. Además, los autores comprobaron que dicha línea era capaz de diferenciarse *in vitro* hacia células similares a condrocitos con gran capacidad de producción de MEC(142).

#### **1.1. Expansión y cultivo de la línea celular de iPSCs A2B**

La expansión de las iPSCs se llevó a cabo en cultivo libre de células alimentadoras o células *feeder*, empleando el kit de cultivo para células madre DEF-CS™ y siguiendo las recomendaciones de la casa comercial. Brevemente, cuando las células se encontraban a una confluencia del 80%, se retiró el medio de cultivo, se lavaron las células dos veces con *PBS* y se incubaron a 37°C durante 5 min con TrypLE™ 1X en dilución 1:10 en *PBS*. Con el fin de comprobar que las células no seguían adheridas al plástico de los frascos de cultivo, éstas fueron visualizadas a través de un microscopio invertido IX51 (*Olympus*).

A continuación, se inactivó la TrypLE™ 1X con el medio basal, se recogió la suspensión y se centrifugó 5 min a 1000 r.p.m. El *pellet* de células obtenido se resuspendió en medio basal suplementado con los factores de crecimiento del kit y se

---

sembró en una mayor superficie para su expansión. Las placas de cultivo, en las que previamente se había preparado un revestimiento con el COAT-1 proporcionado por el kit, se mantuvieron en una estufa a 37°C y con un 5% de CO<sub>2</sub>, realizando cambios de medio diariamente.

## **1.2. Comprobación de la presencia del marcador de pluripotencia *Oct4***

Con el fin de comprobar que las *iPSCs* mantenían su pluripotencia en cultivo, se llevó a cabo un análisis de inmunofluorescencia para detectar la expresión del marcador de pluripotencia *Oct4*, factor de transcripción fundamental que se correlaciona directamente con el mantenimiento de la pluripotencia (Simonsson *et al.*, 2019).

Para ello, las *iPSCs* se sembraron en una densidad de  $2 \times 10^4$  células/pocillo en *chamber-slides* de 8 pocillos (*Costal Corning Incorporated*) y se cultivaron con el kit de cultivo DEF-CS™, tal y como se describió en el apartado anterior. Cuando la confluencia celular fue del 80% aproximadamente, las células fueron fijadas con Histofix (paraformaldehído al 5%; *HistoLab Products AB*, Suecia) durante 10 min a temperatura ambiente, permeabilizadas durante 10 min utilizando Tritón X-100 al 0,1% en *PBS* a temperatura ambiente y bloqueadas utilizando una solución compuesta por glicina 0,1M, 2% de *BSA* y Tritón X-100 al 0,1% en *PBS* 0,01M pH 7,4 durante 15 min. Tras realizar tres lavados de 5 min con *PBS*, se realizó la incubación con el anticuerpo primario (*rabbit anti-mouse OCT-4*; C30A3, *Cell Signaling Technology*, EEUU) en solución de bloqueo a 4°C durante toda la noche y utilizando una dilución 1:400. Transcurrido este tiempo, se realizaron tres lavados de 5 min con *PBS* y se procedió con la incubación del anticuerpo secundario (*goat-anti-rabbit Alexa Fluor 546*; A11071, *Life Technologies*, EEUU), la cual se realizó a temperatura ambiente durante 2 h, en oscuridad y empleando una dilución 1:400.

Finalmente, las preparaciones se montaron utilizando medio de montaje con *DAPI* (*ProLong™ Diamond Antifade Mountant with DAPI*, *Life Technologies*) y se observaron en un microscopio de fluorescencia Eclipse Ti (Nikon).

## **2. Impresión tridimensional**

### **2.1. Preparación de las biotintas para la impresión 3D**

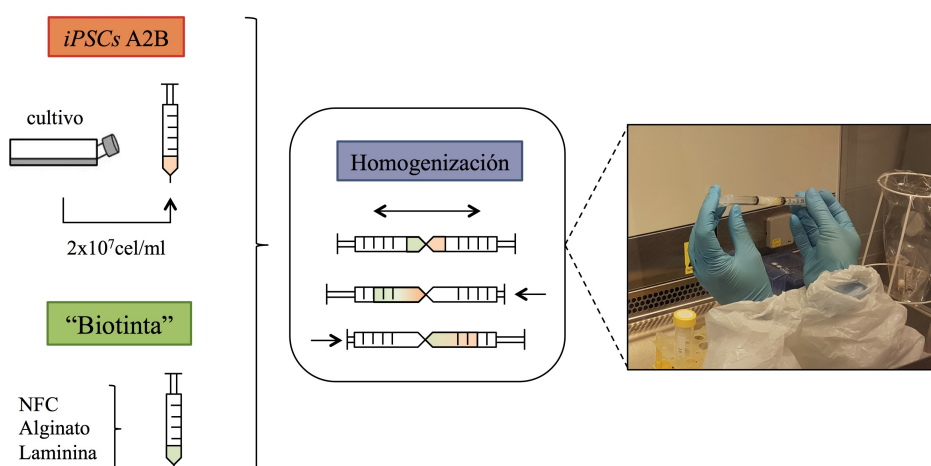
Los materiales empleados para llevar a cabo los experimentos de impresión 3D

---

utilizando la línea de *iPSCs* A2B fueron proporcionadas por la empresa CELLINK AB (Gotemburgo, Suecia). La preparación de las biotintas se realizó en colaboración con el profesor Paul Gatenholm, de la Universidad de Chalmers y se realizó tal y como describieron previamente Markstedt y colaboradores (2015). El material utilizado para la impresión 3D se componía de un 80% de un conjugado de celulosa nanofibrilada (*nanofibrilated cellulose*, *NFC*) y laminina, y de un 20% de alginato (CELLINK AB, Suecia). El tipo de laminina utilizada para preparar las biotintas no se puede especificar en el presente manuscrito por motivos de propiedad intelectual.

## 2.2. Impresión 3D de la línea de *iPSCs* A2B

Para llevar a cabo la impresión 3D, las células A2B en pase 26 se levantaron tal y como se describe en el punto 1.1 y se centrifugaron a 1000 r.p.m durante 10 min, descartando el sobrenadante. El *pellet* de células obtenido se recogió con una jeringuilla estéril (3 ml *sterile syringe*, CELLINK AB). Por otro lado, la biotinta una vez preparada se recogió también en una jeringuilla estéril. La mezcla de las *iPSCs* con la biotinta se llevó a cabo conectando ambas jeringuillas por sus extremos y pasando el contenido de un lado a otro hasta que se obtuvo una mezcla homogénea, tal y como se observa en la figura 13.

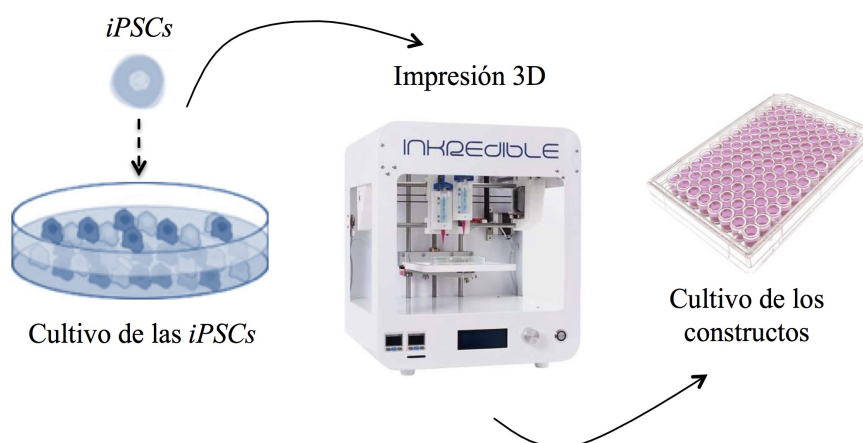


**Figura 13.** Representación esquemática del proceso desarrollado para preparar la mezcla de células *iPSCs* y la biotinta para llevar a cabo la impresión 3D.

Una vez obtenida la mezcla de las *iPSCs* y la biotinta en la densidad deseada,  $2 \times 10^7$  células/ml, se procedió a realizar el proceso de impresión 3D en una impresora de extrusión neumática *INKREDIBLE 3D bioprinter* (CELLINK AB) colocada en el

interior de una campana de flujo laminar y manteniendo las condiciones de esterilidad. Esta impresora se encuentra optimizada para aplicaciones en medicina regenerativa del cartílago y piel.

La impresora se configuró previamente en el laboratorio para imprimir de manera automatizada y directa sobre una placa estéril de 96 pocillos (*Costar Corning Incorporated*) (Figura 14). El patrón de impresión se diseñó y configuró en colaboración con el profesor Paul Gatenholm y consistió en dos capas de la mezcla biotinta-*iPSCs* que formaban una estructura redondeada. Siguiendo este procedimiento, se imprimieron inicialmente un total de 84 constructos en pocillos independientes de la placa de 96 pocillos.



**Figura 14.** Representación esquemática del proceso de impresión 3D realizado.

Una vez realizada la impresión y para que los constructos 3D mantuviesen su forma, éstos se incubaron en una solución de  $\text{CaCl}_2$  100 mM (Sigma-Aldrich) durante 5 min a  $37^\circ\text{C}$ , proceso denominado *cross-linking*. Transcurrido este tiempo, el  $\text{CaCl}_2$  fue reemplazado por medio basal de cultivo suplementado con los factores de crecimiento del kit DEF-CS™, mezclado en proporción 1:1 con medio DEF-CS™ condicionado (Tabla V). El medio de cultivo DEF-CS™ condicionado se obtuvo de retirar diariamente el sobrenadante del medio de cultivo de *iPSCs* al 80% de confluencia y, una vez filtrado, añadir los factores de crecimiento proporcionados por el kit DEF-CS™. Las placas se mantuvieron en una estufa a  $37^\circ\text{C}$  y con un 5% de  $\text{CO}_2$ , realizando cambios de medio diariamente.

### 3. Diferenciación condrogénica *in vitro* de los constructos 3D

Tras una semana de cultivo en medio DEF-CS™ mezclado en proporción 1:1 con medio DEF-CS™ condicionado, se estimuló la diferenciación condrogénica de las *iPSCs* en el interior de los constructos, con el fin de generar un tejido similar al cartílago hialino. Para ello, se cultivaron los constructos en medio condrogénico preparado en el laboratorio (Tabla V), compuesto por *DMEM* rico en glucosa (*PAA Laboratories*, Austria) suplementado con 5 µg/ml de ácido linoleico (Sigma-Aldrich), ITS-G 1X (6,25 µg/ml insulina, 6,25 µg/ml transferrina, 6,25 ng/ml ácido selénico; *Life Technologies*), 1 mg/ml de albúmina sérica humana (ASH, Equitech-Bio, EEUU), 10 ng/ml de factor de crecimiento transformante β1 (*transforming growth factor* β1, *TGF-β1*; R&D Systems, EEUU), dexametasona 10<sup>-7</sup> M (Sigma-Aldrich), 14 µg/ml de ácido ascórbico (*Apotekets production unit*, Suecia) y al 1% con P/E (*PAA Laboratories*).

Los constructos 3D se cultivaron en medio de diferenciación condrogénico durante seis semanas, realizando cambios de medio en días alternos.

**Tabla V.** Tabla resumen en la que se recogen los medios de cultivo empleados en las distintas etapas de desarrollo del objetivo 2, cuándo se utilizaron y la composición de los mismos.

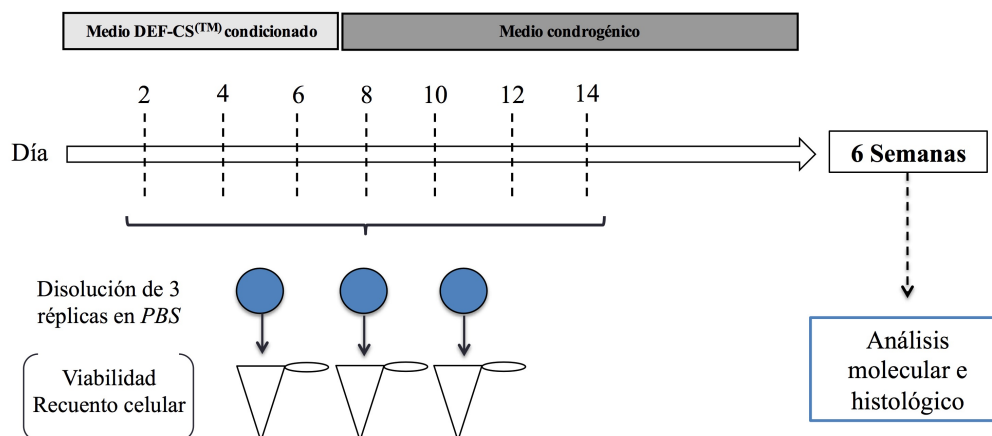
Medio de cultivo	Utilización	Composición
<b>DEF-CS™</b>	Cultivo y expansión de la línea de <i>iPSCs</i> A2B	<ul style="list-style-type: none"> <li>Medio basal</li> <li>Factores GF1, GF2 y GF3 proporcionados por el kit</li> </ul>
<b>DEF-CS™ condicionado</b>	Primera semana tras la impresión 3D	<ul style="list-style-type: none"> <li>DEF-CS™</li> <li>Sobrenadante del cultivo de células A2B al 80% de confluencia, filtrado y con los factores 1, 2 y 3 del kit.</li> </ul>
<b>Medio condrogénico</b>	Una semana después de la impresión 3D y durante 6 semanas	<ul style="list-style-type: none"> <li><i>DMEM</i> rico en glucosa</li> <li>1% P/E</li> <li>ITS 1X</li> <li>Ácido ascórbico 80nM</li> <li>Dexametasona 10<sup>-7</sup>M</li> <li>ASH 1mg/ml</li> <li>Ácido linoleico 5 µg/ml</li> <li><i>TGF-β1</i> 10 ng/ml</li> </ul>

### 4. Estudio de la viabilidad celular en los constructos 3D cultivados *in vitro*

Se analizó la viabilidad celular en el interior de los constructos, así como el crecimiento de las células en el interior de los mismos empleando el contador celular *NucleoCounter NC-200™* (ChemoMetec, Dinamarca). Para ello, cada dos/tres días, se retiraron tres

constructos de las placas de cultivo con ayuda de unas pinzas estériles, se disolvieron de manera independiente en *PBS* con el fin de liberar las células del constructo y se cargaron 60 µl de la suspensión en un casete Via 1-Cassette™ (ChemoMetec) que se introdujo en el contador celular. Estos casetes contienen dos fluoróforos inmovilizados en su interior, naranja de acridina y *DAPI*. Cuando el casete se carga con la suspensión celular, estos fluoróforos se disuelven, de manera que el naranja de acridina tiñe todas las células de la muestra, tanto vivas como muertas, mientras que el *DAPI* sólo atraviesa la membrana de las células muertas. Así, obtenemos tanto el número total de células como el porcentaje de viabilidad de las mismas.

Este procedimiento se llevó a cabo durante las primeras dos semanas de cultivo y se repitió para cada uno de los constructos analizados. Posteriormente, los datos obtenidos fueron analizados mediante el programa GraphPad Prism 6.0 y se representaron como media  $\pm$  desviación estándar (Figura 15).



**Figura 15.** Esquema en el que se representa el flujo de trabajo para llevar a cabo los experimentos de análisis de viabilidad celular y recuento celular durante el proceso de cultivo de los constructos 3D y su diferenciación condrogénica.

## 5. Evaluación de la diferenciación condrogénica *in vitro* de los constructos 3D

Tras seis semanas de cultivo en medio condrogénico, la diferenciación de las *iPSCs* en los constructos 3D se evaluó mediante análisis histológicos y moleculares.

### 5.1. Análisis histológico de la diferenciación condrogénica

Para evaluar de manera cualitativa la formación de neocartílago en los constructos tras 6 semanas de cultivo en medio de diferenciación condrogénico, se llevó a cabo un análisis histológico de los mismos. Para ello, los constructos se lavaron dos veces con *PBS* con

calcio y magnesio (Gibco, *ThermoFisher Scientific*) y, a continuación, éstos fueron fijados durante 10 min en Histofix a temperatura ambiente. La presencia de iones de calcio y magnesio en el *PBS* previene que los constructos se deshagan y pierdan su forma.

Transcurrido este tiempo, las muestras (n=2) se pasaron a tubos estériles de 1,5 ml con una solución de etanol al 70% (Sigma-Aldrich) en *PBS* con calcio y magnesio, y se enviaron a los servicios de histomorfología del laboratorio (*HistoLab, Sahlgrenska Hospital*). Allí, las muestras se incluyeron en parafina, se realizaron cortes en el microtomo (secciones de 10  $\mu$ m) y se tiñeron con azul-alcián van Gieson (AA-vG). Esta tinción muestra en color azul los proteoglicanos mientras que las fibras de colágeno aparecen en color rojo/rosáceo.

## **5.2. Análisis molecular de la diferenciación condrogénica**

### **5.2.1. Extracción y cuantificación de ARN**

Transcurridas seis semanas de diferenciación condrogénica, se recogieron 5 constructos y se almacenaron a -80°C hasta que se llevó a cabo el proceso de extracción de ARN. Además, se recogieron 5 constructos antes de empezar con el proceso de diferenciación, cuando las células llevaban una semana en cultivo, que también se almacenaron a -80°C hasta que se llevó a cabo el proceso de extracción de ARN.

Previo a la extracción de ARN, se llevó a cabo la lisis de los constructos 3D en un *TissueLyser LT* (Qiagen, Holanda), utilizando 2 esferas de acero de 5 mm de diámetro (*Stainless Steel Beads, 5 mm; Qiagen*) por cada tubo (*Eppendorf® Safe-Lock microtubes PCR clean, Sigma-Aldrich*). Los tubos con los constructos y las esferas, así como el adaptador para los tubos, se enfriaron previamente en hielo seco con el fin de evitar la degradación del ARN durante el proceso de lisis. Se realizaron dos ciclos de 2 min a 25 Hz, enfriando tanto los tubos como el adaptador entre ciclos.

Una vez obtenido un pulverizado a partir de los constructos 3D, se añadió 1 ml de QIAzol® (Qiagen) a cada tubo y se dejaron atemperar a temperatura ambiente durante 3-5 min. A continuación, se realizaron otros dos ciclos de agitación de 2 min a 25 Hz. Seguidamente, se añadieron 200  $\mu$ l de cloroformo (Sigma-Aldrich) y se agitaron los tubos fuertemente en un vórtex durante 15 s. Tras 2-3 min a temperatura ambiente, los tubos se centrifugaron a 13000 r.p.m durante 15 min a 4°C y se recogieron

---

aproximadamente 600 µl de sobrenadante en nuevos tubos de 2 ml. Se añadió igual volumen de etanol al 70% (Sigma-Aldrich), mezclando bien con la pipeta, y se transfirió la mezcla a columnas de extracción *RNeasy MinElute spin column* (Qiagen).

A continuación, se procedió inmediatamente siguiendo las instrucciones del fabricante para la purificación de ARN total a partir de tejidos animales y humanos.

Finalmente, la cantidad y calidad del ARN obtenido se determinó en un espectrofotómetro *NanoDrop™ ND-2000* (ThermoFisher Scientific).

### **5.2.2. Síntesis de ADN complementario**

Una vez obtenido y analizado el ARN total, se realizó la retrotranscripción del ARN a ADNc en un termociclador (2720 *Thermal Cycler*, Applied Biosystems), con el kit *High-Capacity cDNA Reverse Transcriptase Kit with RNase inhibitor* (Applied Biosystems), utilizando como cebadores *random hexamers* y siguiendo las recomendaciones de la casa comercial. El protocolo de *PCR* fue el siguiente: 25°C 10 min, 37°C 120 min, 85°C 5 min y una fase final de enfriamiento a 4°C.

Las muestras de ADNc fueron almacenadas a -20°C hasta el momento de realización de los análisis de expresión génica mediante *qRT-PCR*.

### **5.2.3. PCR cuantitativa en tiempo real**

El análisis molecular de la diferenciación condrogénica en los constructos 3D se realizó mediante la técnica de *qRT-PCR*, empleando sondas TaqMan™ (Applied Biosystems) y en un termociclador 7900HT *Fast Real-Time PCR System* (Applied Biosystems). Se estudió la expresión del gen característico de pluripotencia *OCT4* (Hs01895061\_u1) y de dos genes característicos de la diferenciación condrogénica: *COL-2* (*COL2A1*, Hs01064869\_m1) y la región determinante del sexo-caja 9 [*SRY* (*Sex determining Region Y*)-box 2] (*SOX9*) (Hs00165814\_m1), antes y después de la diferenciación.

La reacción de *PCR* consistió en 20 µl de Master Mix (10 µl de TaqMan 2X, 1 µl de sonda, 4 µl H<sub>2</sub>O) y 5 µl de ADNc a una concentración de 0,5 ng/µl. Los experimentos se diseñaron de forma que cada muestra contase con una réplica técnica. Todas las muestras se trataron con *RNase-Free DNase* (Qiagen GmbH, Alemania) con el fin de evitar contaminación con ADN genómico. El protocolo de *PCR* consistió en una fase inicial de 2 min de duración a 50°C, una segunda fase de 10 min a 95°C, una tercera fase

---



con 40 ciclos de 15 s a 95°C y 1 min a 60°C, y una fase final de enfriamiento a 4°C.

Los NRE se calcularon en relación al gen constitutivo de referencia *CREBB* (*CREB binding protein*) (Hs00231733\_m1), el cual había sido previamente puesto a punto en el laboratorio, utilizando el método  $2^{-\Delta\Delta CT}$  y un calibrador interno.



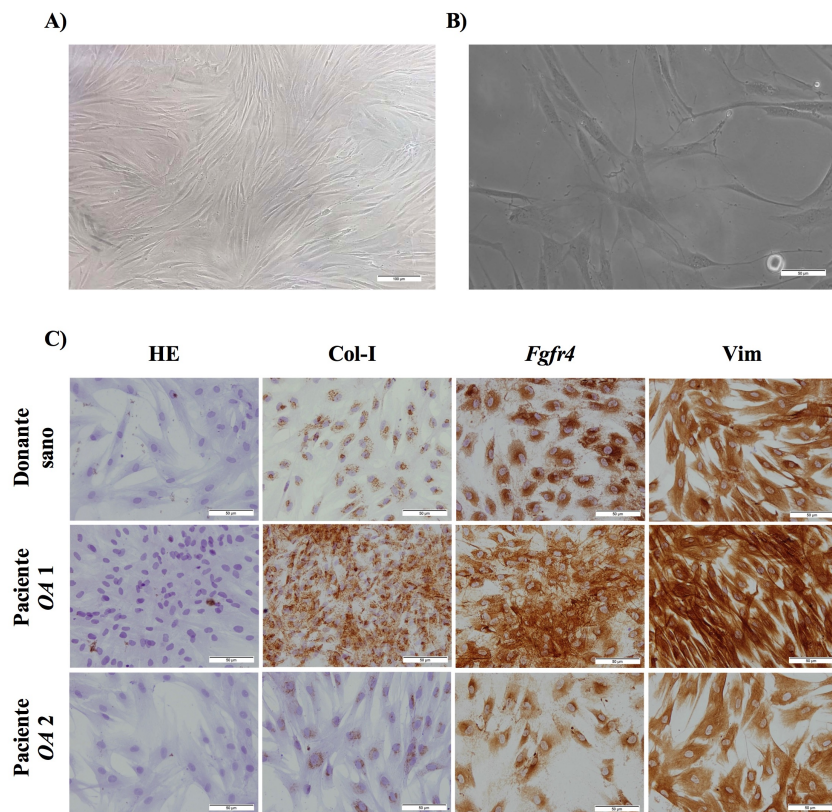
## **IV. RESULTADOS DEL OBJETIVO 1**



## 1. Aislamiento y caracterización de fibroblastos dermales humanos

Utilizando la técnica de cultivo por explantes descrita anteriormente, se aislaron células a partir de las biopsias de piel de las pacientes *OA 1*, *OA 2* y la donante sana. Tras dos semanas en cultivo, se obtuvo un número suficiente de células para llevar a cabo su caracterización y la reprogramación celular.

Las imágenes de contraste de fases mostraron que, tras 2-3 subcultivos, se obtenían poblaciones celulares uniformes (Figura 16A) con una morfología fusiforme, largas prolongaciones citoplasmáticas y núcleo ovoide, similar a la morfología característica de los fibroblastos (Figura 16B). Por su parte, el análisis inmunohistoquímico reveló que aproximadamente el 90% de las células en cultivo mostraban tinción positiva para las proteínas características de fibroblastos Col-1, *Fgfr4* y Vim (Figura 16C).



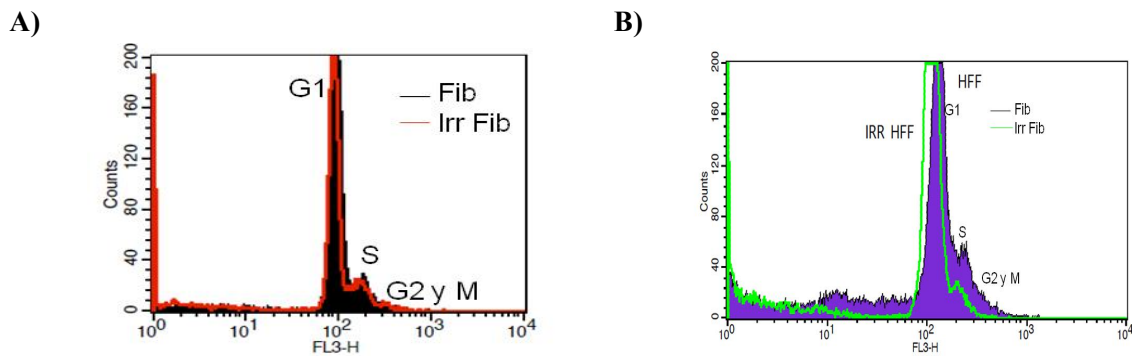
**Figura 16.** Caracterización de fibroblastos dermales humanos. (A) Cultivo de fibroblastos obtenido mediante la técnica de cultivo por explantes a partir de biopsias de piel de la paciente *OA 1*. Escala 100  $\mu$ m. (B) Detalle del cultivo de fibroblastos. Escala 50  $\mu$ m. (C) Imágenes de la tinción hematoxilina-eosina (HE) y de las tinciones inmunohistoquímicas para colágeno de tipo I (Col-1), receptor de crecimiento fibroblástico 4 (*Fgfr4*) y vimentina (Vim) realizadas como parte del proceso de caracterización de los cultivos de fibroblastos dermales de la donante sana, la paciente *OA 1* y la paciente *OA 2*. Escala 50  $\mu$ m.

Estos resultados confirman la obtención de fibroblastos a partir de las biopsias de piel de pacientes.

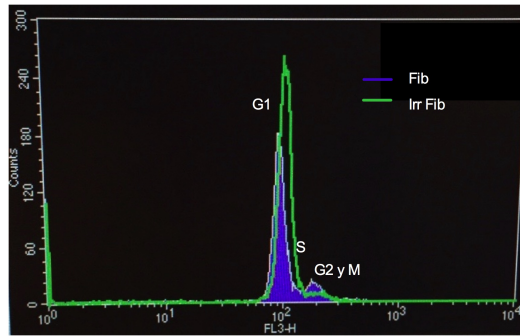
## 2. Establecimiento de la dosis efectiva de radiación para el cultivo de células alimentadoras o *feeders*

Los análisis de ciclo celular mediante citometría de flujo mostraron que la irradiación de  $1 \times 10^6$  células/40 ml a una dosis de 70 Gy en la unidad de cobalto-60 no provocaba mayores niveles de detención del ciclo celular, sin observarse diferencias entre las células irradiadas y sin irradiar (Figura 17A). Por otro lado, tal como se observa en la figura 17B, la irradiación a 100 Gy provocó mayor detención de las células irradiadas, por lo que se estableció como efectiva esta dosis de radiación para generar los *stocks* de células alimentadoras o *feeder*.

Por otro lado, la irradiación de las células *HFF* en el acelerador lineal *Varian Unique* con una dosis de 75 Gy mostró mayor detención del ciclo celular en comparación con las células *HFF* sin irradiar (Figura 18), por lo que se estableció esta dosis de radiación como efectiva para generar los *stocks* de células alimentadoras o *feeders*.



**Figura 17.** Gráficos de citometría de flujo para el estudio del ciclo celular tras irradiación a 70 y 100 Gy. En el eje X, FL3-H representa la fluorescencia relativa en el canal de emisión del yoduro de propidio; en el eje Y, se observa el conteo de células (*counts*). (A) Dosis de 70 Gy. En negro, se representa la curva correspondiente a los fibroblastos de prepucio humanos (Fib) sin irradiar; la curva roja corresponde a las células irradiadas (Irr Fib). G1: Intervalo 1 del ciclo celular; S: fase de síntesis; G2: Intervalo 2; M: mitosis. (B) Dosis de 100 Gy. En violeta, se representa la curva correspondiente a los fibroblastos de prepucio humanos (HFF, Fib) sin irradiar; la curva verde corresponde a las células irradiadas (IRR HFF, Irr Fib). G1: Intervalo 1 del ciclo celular; S: fase de síntesis; G2: Intervalo 2; M: mitosis.



**Figura 18.** Gráfico de citometría de flujo para el estudio del ciclo celular tras irradiación a 75 Gy. En el eje X, FL3-H representa la fluorescencia relativa en el canal de emisión del yoduro de propidio; en el eje Y, se observa el conteo de células (*counts*). En violeta, se representa la curva correspondiente a los fibroblastos de prepucio humanos (Fib) sin irradiar; la curva verde corresponde a las células irradiadas (Irr Fib). G1: Intervalo 1 del ciclo celular; S: fase de síntesis; G2: Intervalo 2; M: mitosis.

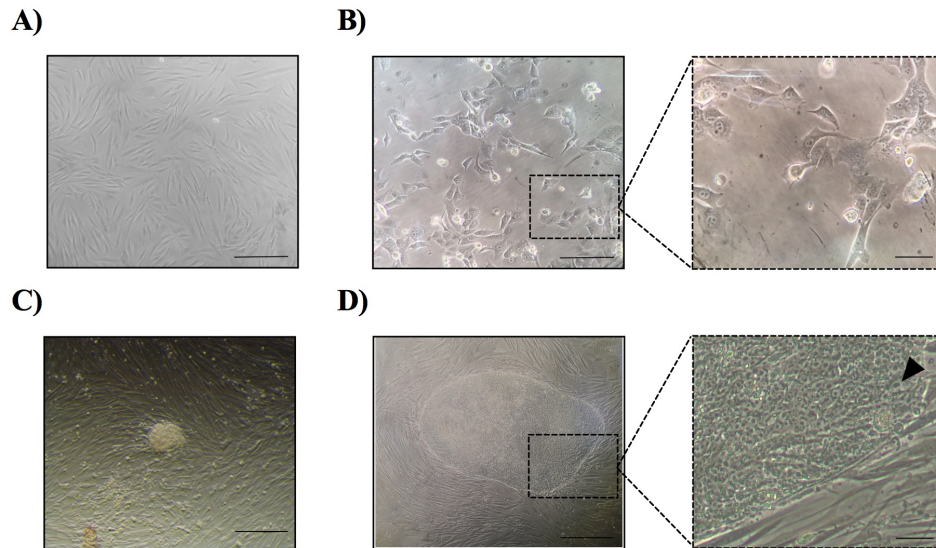
### 3. Reprogramación no integrativa de los fibroblastos dermales

Con el fin de generar *iPSCs* humanas minimizando el riesgo de anomalías genéticas en las células, a partir de fibroblastos dermales de las pacientes *OA 1*, *OA 2* y la donante sana, se introdujeron los factores de reprogramación *OSKM* mediante un método no integrativo que implica utilizar vectores modificados del *SV*.

Después de 24 h de haber realizado el proceso de reprogramación, los fibroblastos dermales experimentaron un marcado cambio morfológico, pasando de presentar una forma fusiforme típicamente fibroblástica (Figura 19A) a una morfología más poligonal o de tipo epitelial (Figura 19B). Una semana después de la reprogramación, se detectaron en cultivo varias colonias pequeñas y compactas (Figura 19C), que crecieron rápidamente. Así, 22 días después de la transducción, éstas colonias presentaban una morfología similar a las colonias de *ESCs*, es decir, colonias compactas con bordes definidos, un elevado ratio núcleo/citoplasma y nucléolos prominentes (Figura 19D).

En base a la morfología de las colonias y la tinción para detectar actividad fosfatasa alcalina, la eficiencia estimada del proceso de reprogramación fue de un 1,18% en la donante sana, 0,2% en la paciente *OA 1* y 0,95% en la paciente *OA 2*.

Cuando las colonias de *iPSCs* alcanzaron un tamaño adecuado, aproximadamente 4 semanas tras la reprogramación, pequeños fragmentos de 10-15 colonias seleccionadas de cada donante se pasaron mecánicamente a placas de cultivo con nuevas células alimentadoras, tal como se describió en el apartado 4.1 de material y métodos. La mayoría de estos subcultivos (clones) dieron lugar a nuevas colonias similares a colonias de *ESCs*.



**Figura 19.** Reprogramación no integrativa de fibroblastos dermales. (A) Cultivo de fibroblastos dermales antes de llevar a cabo el proceso de reprogramación celular. Escala 200  $\mu\text{m}$ . (B) Cultivo de fibroblastos 24 h después de la reprogramación y detalle del mismo. Escala 200  $\mu\text{m}$  y 50  $\mu\text{m}$  respectivamente. (C) Colonia de células detectada en cultivo 1 semana después de la reprogramación. Escala 200  $\mu\text{m}$ . (D) Colonia de células 22 días después de haber realizado el proceso de reprogramación celular y detalle de la misma. La punta de flecha señala los nucléolos prominentes. Escala 200  $\mu\text{m}$  y 50  $\mu\text{m}$  respectivamente.

#### 4. Puesta a punto del cultivo de las *iPSCs* en sistema libre de células alimentadoras o *feeders*

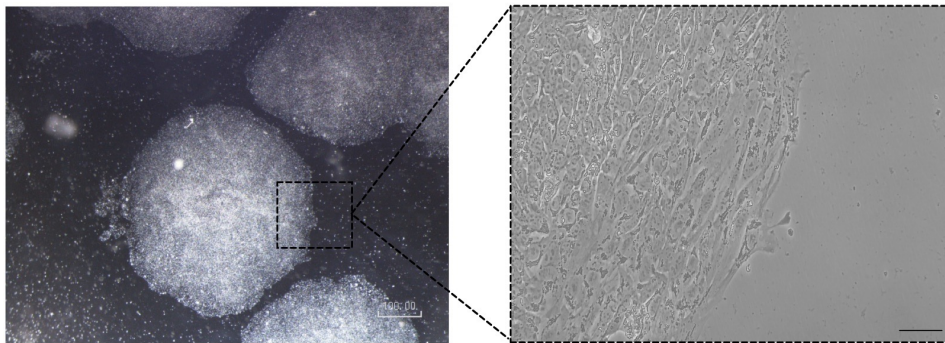
La primera prueba de adaptación de las *iPSCs* al cultivo libre de células *feeders* se realizó empleando una matriz de Matrigel® junto con medio condicionado de células *feeder*. Tras el primer pase, realizado mecánicamente con micropipeta “*stripper*”, los clones de las tres donantes se adhirieron al plástico de cultivo, apareciendo bajo el microscopio como pequeñas agrupaciones de células compactas que crecían manteniendo la morfología de colonia redondeada.

Sin embargo, al realizar el siguiente pase tanto mecánica como enzimáticamente con Versene, los fragmentos de colonia no se adherían al plástico de cultivo. Adicionalmente, se testó si la adición al medio de cultivo del inhibidor de la apoptosis *Rock Inhibitor* Y-27632 mejoraba la supervivencia y adherencia de los fragmentos de colonia al plástico de cultivo. Utilizando la concentración de esta molécula recomendada por la casa comercial (1  $\mu\text{l/ml}$ ), se subcultivaron los clones de *iPSCs* durante 4 pases en sistema libre de *feeders*. A partir del cuarto pase, los fragmentos de colonia permanecían suspendidos en el medio de cultivo y no se adherían a las placas, no siendo posible cultivar ni expandir las células con este sistema.



La segunda prueba de adaptación se realizó utilizando nuevamente una matriz de Matrigel® y medio condicionado de células *MEF*. En este caso, se obtuvieron resultados similares a los descritos anteriormente para el medio condicionado de células *feeder*. Aunque inicialmente los fragmentos de colonia no se adherían al plástico de cultivo, la adición de 1 µl/ml de *Rock Inhibitor* Y-27632 mejoró la supervivencia de las células y el cultivo de las colonias hasta el pase 4. A partir de este pase, sólo uno de los clones de la donante sana (clon #H) se pudo adaptar al sistema libre de células *feeders*, creciendo con la morfología deseada de las colonias (Figura 20) y permitiendo la expansión de las células cuando ésta se realizaba de manera manual con micropipeta “stripper”.

**Matrigel® + medio condicionado de células *MEF***

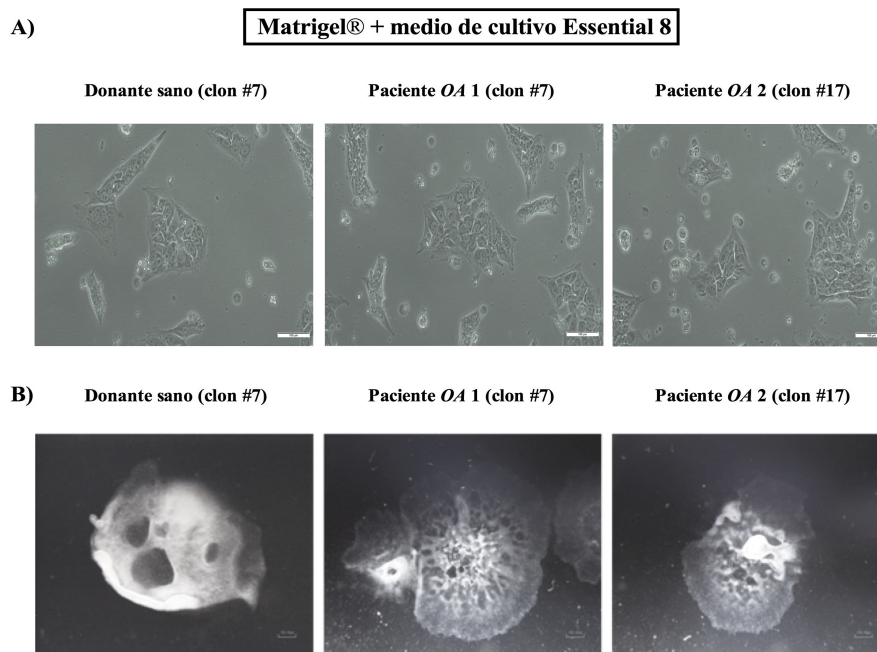


**Figura 20.** Cultivo de *iPSCs* en Matrigel® + medio condicionado de células *MEF*. Derecha: imagen tomada con estereomicroscopio SMZ-745T de las colonias de *iPSCs* (clon #H) en sistema libre de *feeders*. Izquierda: imagen tomada con microscopio invertido mostrando en detalle una de las colonias. Escala: 100 µm y 50 µm, respectivamente.

Sin embargo, dado que sólo se pudo adaptar el clon #H y que dicho clon no fue seleccionado como candidato para establecer la línea de *iPSCs* (tal y como se describirá a continuación en el punto 5.2 del apartado resultados), este sistema de cultivo libre de *feeders* fue descartado.

Dado que ninguno de los medios condicionados preparados en el laboratorio permitió la adaptación de las células al sistema de cultivo libre de *feeders*, se testó a continuación un medio de cultivo comercial, *Essential 8*, en combinación con la misma matriz de Matrigel®. Los fragmentos de colonia no se adhirieron al plástico de cultivo tras el primer pase, por lo que se realizó una nueva adaptación suplementando el medio de cultivo con Revitacell™. En este caso, se observaron fragmentos de colonias adheridos

al plástico de cultivo (Figura 21A) en todos los clones seleccionados, que crecieron en forma de colonias de morfología redondeada pero poco compactas. Cuando las células proliferaron en cultivo y las colonias aumentaron de tamaño, su morfología no fue la deseada, observándose zonas diferenciadas especialmente en su parte central que, en ocasiones, formaron *EBs* espontáneos (Figura 21B). Es por ello que esta combinación de matriz y medio de cultivo no se seleccionó para establecer los cultivos libres de *feeders*.



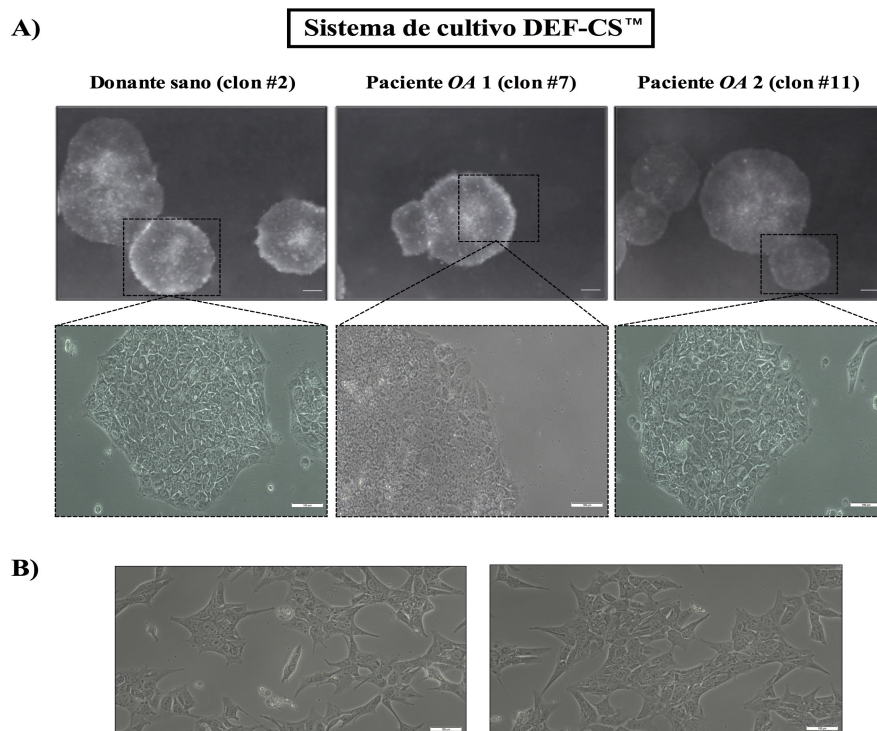
**Figura 21.** (A) Imágenes tomadas en microscopio invertido de las células *iPSCs* tras el primer pase al sistema libre de *feeders* en medio de cultivo Essential 8 suplementado con Revitalcell™. Escala 100 µm (B) Imágenes tomadas con estereomicroscopio SMZ-475T, de las colonias de *iPSCs* en sistema de cultivo libre de *feeders* utilizando Matrigel® y medio de cultivo Essential 8. Escala 100 µm.

Con el objetivo de comprobar si los clones de *iPSCs* no se adherían al plástico de cultivo debido a la matriz de Matrigel®, se realizaron dos pruebas de adaptación empleando el medio *Essential 8*, tanto suplementado como sin suplementar con Revitacell™, en combinación con dos matrices diferentes: vitronectina y Geltrex™. Sin embargo, ninguno de estos dos sistemas permitió la adaptación de las células, puesto que los fragmentos de colonia no se adherían al plástico de cultivo tras el primer pase.

Se obtuvieron los mismos resultados cuando se combinó la matriz de Geltrex™ con el medio de cultivo StemFlex.

El sistema de cultivo DEF-CS™ posibilitó la adaptación al sistema libre de *feeders* de

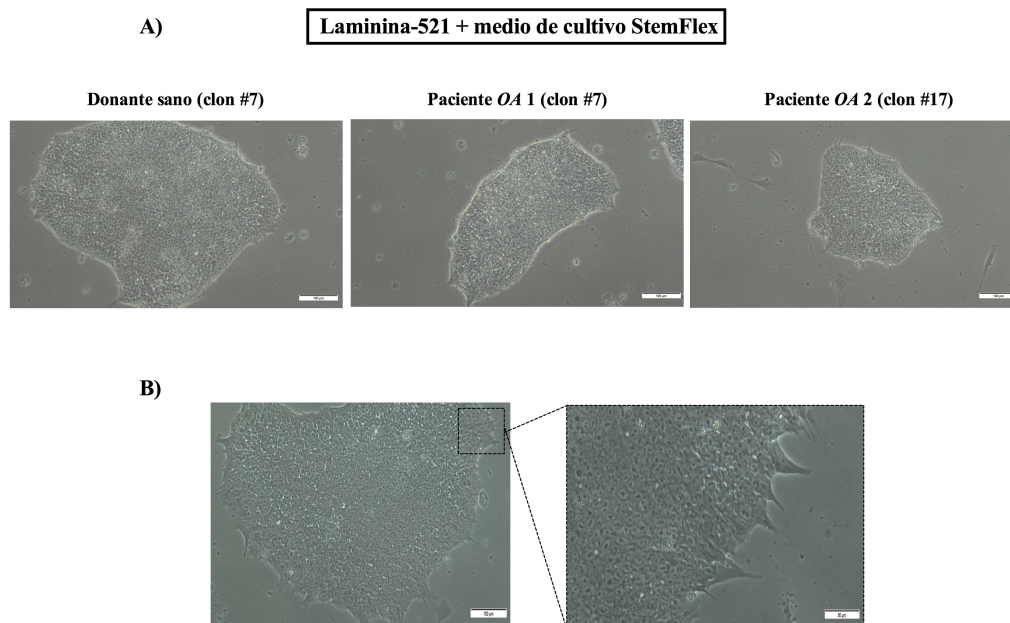
un clon de la donante sana (clon #2), un clon de la paciente OA 1 (clon #7) y dos clones de la paciente OA 2 (clones #11 y #17). En este caso, tras el primer pase de manera mecánica, se obtuvieron colonias de células de aspecto homogéneo y morfología redondeada que se adherían al plástico de cultivo (Figura 22A). Los subcultivos se realizaron utilizando la micropipeta “stripper” y, en función de las necesidades experimentales, con la enzima TrypLE™ 1X. El resto de clones de las pacientes OA y la donante sana bien no se adherían al plástico de los frascos de cultivo o no presentaban la morfología deseada, creciendo a modo de monocapa (Figura 22B). Utilizando este sistema, se estableció el cultivo libre de *feeders* del clon #7 de la paciente OA 1, puesto que el resto de clones no fueron seleccionados como candidatos para realizar el proceso de caracterización (punto 5.2 del apartado resultados).



**Figura 22.** Cultivo de *iPSCs* en sistema DEF-CS™. (A) Imágenes tomadas con estereomicroscopio SMZ-475T de las colonias de *iPSCs* cultivadas con el kit DEF-CS™, y detalle de las mismas en microscopio invertido. Escala: 100  $\mu$ m. (B) Imágenes tomadas con microscopio invertido de células *iPSCs* creciendo en monocapa en sistema de cultivo DEF-CS™. Escala: 100  $\mu$ m.

Cuando se realizó la adaptación de los clones de *iPSCs* al sistema de cultivo constituido por una matriz de laminina y el medio de cultivo StemFlex, se observó elevada muerte celular y abundantes fragmentos de colonias suspendidos en el medio de cultivo tras el primer pase. Sin embargo, tras realizar el cambio de medio, los pequeños grupos de

células que se observaron adheridos a las placas comenzaron a proliferar, manteniendo la morfología de colonias con borde definido y aspecto compacto (Figura 23A). Transcurridos 5-6 días desde el primer pase, se realizó un segundo subcultivo manual. El tercer subcultivo se realizó 5-6 días después, utilizando la enzima Versene. Las células mantuvieron el crecimiento a modo de colonia; no obstante, dichas colonias eran más aplanadas y, en ocasiones, menos compactas que cuando se cultivaban sobre *feeders*. Los bordes de las colonias eran menos redondeados, especialmente el día después del pase (Figura 23B).



**Figura 23.** Cultivo de *iPSCs* en laminina-521 y medio de cultivo StemFlex. (A) Imágenes tomadas con microscopio invertido de las colonias de *iPSCs* de cada donante. Escala: 100 µm. (B) Imagen representativa de una de las colonias de *iPSCs* después del día del pase en medio StemFlex y matriz de laminina-521, mostrando detalle de los bordes menos redondeados. Escala: 100 µm (imagen izquierda) y 50 µm (imagen derecha).

Utilizando este último sistema de cultivo se adaptaron dos clones de la donante sana (clones #2 y #7), un clon de la paciente OA 1 (clon #7) y dos clones de la paciente OA 2 (clones #11 y #17). Es importante destacar que, a lo largo del proceso de adaptación, se observó que la obtención de un tamaño adecuado de los fragmentos de colonia, tanto en el pase manual como enzimático, resultaba crucial para lograr la adaptación de las células. Fragmentos demasiado pequeños se diferenciaban en cuanto se adherían al plástico o no se adherían y fragmentos demasiado grandes formaban *EBs* de manera espontánea.

Por lo tanto, los sistemas de cultivo libre de *feeders* que se establecieron para llevar a cabo la expansión y caracterización de las células *iPSCs* fueron:

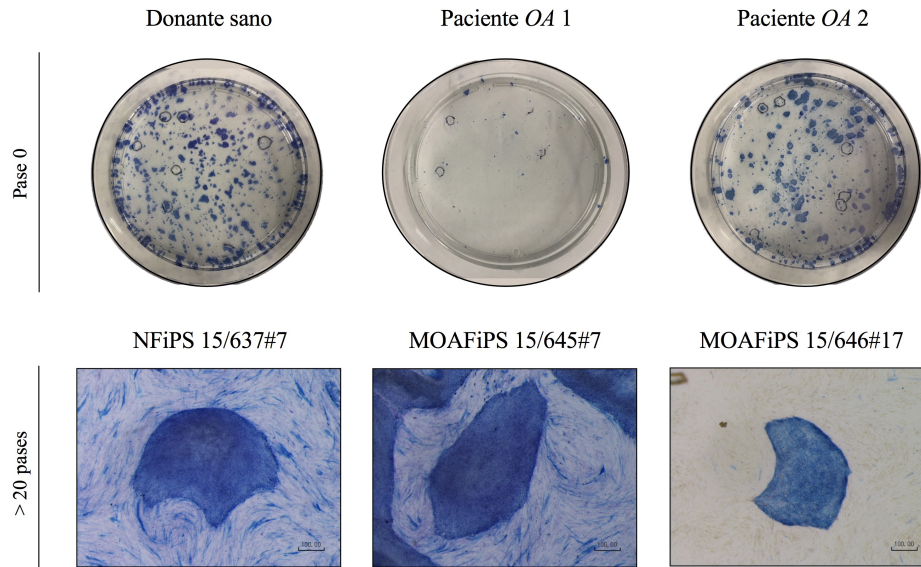
- Sistema DEF-CS™ para el clon #7 de la paciente OA 1. Se estableció un protocolo basado en las recomendaciones de la casa comercial, pero realizando los subcultivos de manera manual con micropipeta “*stripper*”. En caso de necesidad experimental, las células se levantaron con TrypLE™ 1X para poder llevar a cabo el conteo celular.
- Medio de cultivo StemFlex y matriz de laminina-521 para el clon #7 de la donante sana y el #17 de la paciente OA 2. Se estableció un protocolo basado en las recomendaciones de la casa comercial. Adicionalmente, los dos primeros subcultivos se realizaron manualmente con micropipeta “*stripper*” y, en adelante, las células se levantaron con la enzima Versene. Tras 3-4 subcultivos con Versene, las células se sembraban en proporción 1:20 para garantizar que las colonias crecían sin diferenciarse hasta alcanzar la confluencia. Para obtener un tamaño adecuado de los fragmentos de colonia, éstos se recogían en tubos Falcon de 15 ml y se pipeteaba cuidadosamente la suspensión 5-7 veces, arriba y abajo, antes de transferirlos a nuevas placas de cultivo. El día de pase, el medio de cultivo se suplementaba con Revitacell™ 100X.

## **5. Caracterización de las *iPSCs* generadas**

### **5.1. Actividad fosfatasa alcalina**

Las colonias de *iPSCs* que surgieron en las placas de cultivo de 100 cm<sup>2</sup> tras el proceso de reprogramación de los fibroblastos dermales de las tres donantes adquirieron coloración azul cuando se trataron con el kit para detectar actividad fosfatasa alcalina, mostrando así la presencia de esta actividad enzimática. Los clones de *iPSC* también presentaron positividad para la actividad fosfatasa alcalina y dicha positividad se mantuvo con los sucesivos subcultivos (Figura 24).





**Figura 24.** Tinción para detectar actividad de la enzima fosfatasa alcalina en las colonias de *iPSCs* de cada donante en pase 0 y en las colonias de *iPSCs* de la donante sana clon #7 (NFiPS 15/637#7), la paciente *OA* 1 clon #7 (MOAFiPS 15/645#7) y la paciente *OA* 2 clon #17 (MOAFiPS 15/646#17) con más de 20 pases en cultivo sobre células *feeder*. Escala: 100 µm.

## 5.2. Análisis de expresión génica

De acuerdo con las características morfológicas de las colonias y la positividad para la actividad fosfatasa alcalina, se seleccionaron cuatro clones (#E, #H, #2 y #7) de la donante sana, dos clones (#4 y #7) de la paciente *OA* 1 y cuatro clones (#9, #11, #12 y #17) de la paciente *OA* 2 para llevar a cabo el análisis molecular de los marcadores de pluripotencia, así como para estudiar el silenciamiento del virus.

Los análisis de *qRT-PCR* mostraron que todos los clones seleccionados expresaban los factores de reprogramación endógenos (*OCT4* ENDO, *SOX2* ENDO, *KLF4* ENDO y *CMYC* ENDO), así como los genes característicos de las *ESCs* humanas *NANOG* y *CRIPTO*. Los resultados de los NRE de cada uno de estos genes se recogen en la tabla VI.

Tal y como se observa en la figura 25, los NRE para estos marcadores de pluripotencia aumentaron notablemente en las *iPSCs* en comparación con los fibroblastos dermales parentales, exceptuando los NRE de *KLF4* ENDO y *CMYC* ENDO, que fueron ligeramente mayores en los fibroblastos parentales.

Entre los clones seleccionados de la donante sana, el clon #H fue el que presentó mayor expresión tanto de *CRIPTO* como de *NANOG*. Sin embargo, también se detectó expresión de *CMYC* del vector del virus Sendai (*CMYC* virus). El clon #E presentó altos

NRE de *OCT4 ENDO* y *CRIPTO*, pero no de *NANOG*. Los clones #2 y #7 presentaron NRE similares para todos los genes, con excepción de *SOX2 ENDO*, *CMYC ENDO* y *CRIPTO* que fueron mayores en el clon #2.

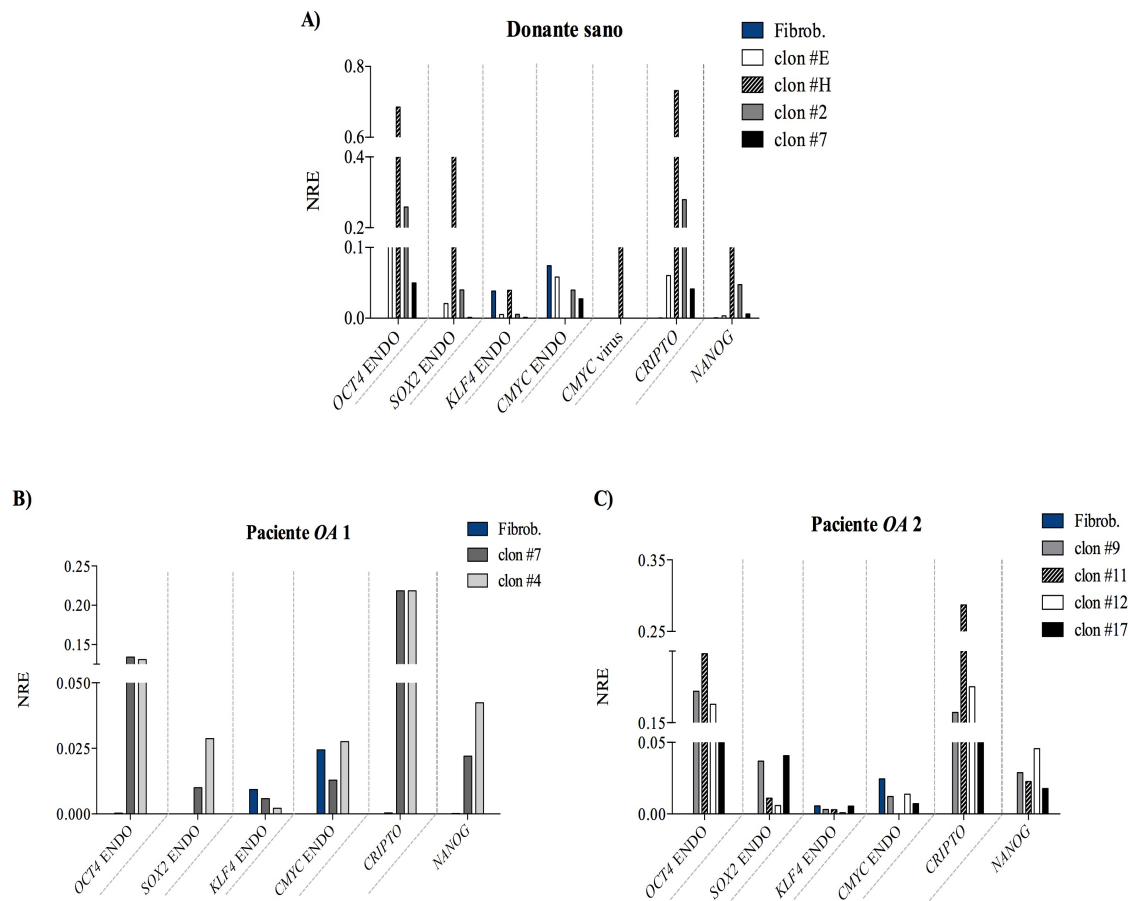
**Tabla VI.** Niveles relativos de expresión (NRE) de los factores de reprogramación endógenos (*OCT4 ENDO*, *SOX2 ENDO*, *KLF4 ENDO*, *CMYC ENDO*), los genes característicos de pluripotencia (*CRIPTO*, *NANOG*) y genes del *SV* (*CMYC virus*, *VIRUS SENDAI*) en los clones de *iPSCs* de cada donante y en los fibroblastos dermales parentales antes de realizar el proceso de reprogramación.

DONANTE	CLON	Factores de reprogramación endógenos				Genes pluripotencia		<i>CMYC virus</i>	<i>VIRUS SENDAI</i>
		<i>OCT4 ENDO</i>	<i>SOX2 ENDO</i>	<i>KLF4 ENDO</i>	<i>CMYC ENDO</i>	<i>CRIPTO</i>	<i>NANOG</i>		
Donante sano	#2	0,259	0,040	0,006	0,040	0,279	0,048	0,000	No detectado
	#7	0,050	0,001	0,001	0,027	0,041	0,006	0,000	No detectado
	#E	0,185	0,021	0,005	0,058	0,060	0,003	0,000	No detectado
	#H	0,685	0,410	0,039	0,000	0,732	0,165	0,102	No detectado
	Fibroblastos	0,000	0,000	0,038	0,074	0,000	0,000	0,000	No detectado
Paciente OA 1	#4	0,131	0,029	0,002	0,028	0,218	0,042	0,000	No detectado
	#7	0,134	0,010	0,006	0,013	0,022	0,218	0,000	No detectado
	Fibroblastos	0,000	0,000	0,009	0,024	0,000	0,000	0,000	No detectado
Paciente OA 2	#9	0,172	0,037	0,003	0,012	0,157	0,029	0,000	No detectado
	#11	0,198	0,011	0,003	0,000	0,287	0,023	0,000	No detectado
	#12	0,163	0,006	0,001	0,014	0,175	0,045	0,000	No detectado
	#17	0,109	0,041	0,006	0,007	0,098	0,018	0,000	No detectado
	Fibroblastos	0,000	0,000	0,006	0,024	0,000	0,000	0,000	No detectado

Con respecto a la paciente OA 1, ambos clones #4 y #7 presentaron altos NRE de *OCT4 ENDO* y *CRIPTO* en comparación con los de los fibroblastos dérmicos parentales. Los niveles de *NANOG*, *SOX2 ENDO* y *CMYC ENDO* fueron ligeramente más altos en el clon #4 que en el clon #7.

Todos los clones seleccionados de la paciente OA 2 presentaron niveles similares de los factores de reprogramación endógenos y los marcadores de pluripotencia, siendo estos niveles más altos que los observados en los fibroblastos dermales parentales. Cabe destacar que los clones #9 y #12 presentaron mayores NRE de *CMYC ENDO* que los clones #11 o #17.

Debido a los bajos NRE de *CMYC ENDO*, junto con los altos NRE de los marcadores de pluripotencia *OCT4 ENDO*, *CRIPTO* y *NANOG*, los clones candidatos seleccionados para continuar con el proceso de caracterización fueron: clon #7 de la donante sana, clon #7 de la paciente OA 1 y clon #17 de la paciente OA 2. A pesar de que el clon #2 de la donante sana y el #4 de la paciente OA 1 presentaron mayores NRE de algunos de estos genes, éstos clones no fueron seleccionados puesto que presentaron mayores NRE de *CMYC ENDO*, lo que podría comprometer la seguridad de las líneas generadas.



**Figura 25.** Análisis de expresión génica en los clones de *iPSCs*. (A) Niveles relativos de expresión (NRE) de los factores de reprogramación endógenos (*OCT4 ENDO*, *SOX2 ENDO*, *KLF4 ENDO*, *CMYC ENDO*), los genes característicos de pluripotencia (*CRIPTO*, *NANOG*) y genes del virus Sendai (*CMYC*) de (A) los clones #E, #H, #2 y #7 de la donante sana, así como en los fibroblastos parentales antes de reprogramar; (B) los clones #7 y #4 de la paciente OA 1, así como en los fibroblastos parentales antes de reprogramar; y (C) los clones #9, #11, #12 y #17 de la paciente OA 2, así como en los fibroblastos parentales antes de reprogramar.

### 5.3. Análisis histológico de marcadores de pluripotencia en las colonias de *iPSCs*

Los tres clones estudiados presentaron positividad para NANOG, marcador intracelular asociado a la auto-renovación de las *PSCs*. Estos clones presentaron además positividad para el marcador de superficie relacionado con la pluripotencia TRA1-81 (Figura 26A).

La fluorescencia roja asociada con NANOG se detectó predominantemente en el núcleo celular, mostrando un patrón similar al de *DAPI* (Figura 26B); mientras que la



fluorescencia verde, específica para TRA1-81, mostró una localización citoplásmica (Figura 26C). Estos patrones fueron comunes en los tres clones de *iPSCs* estudiados.

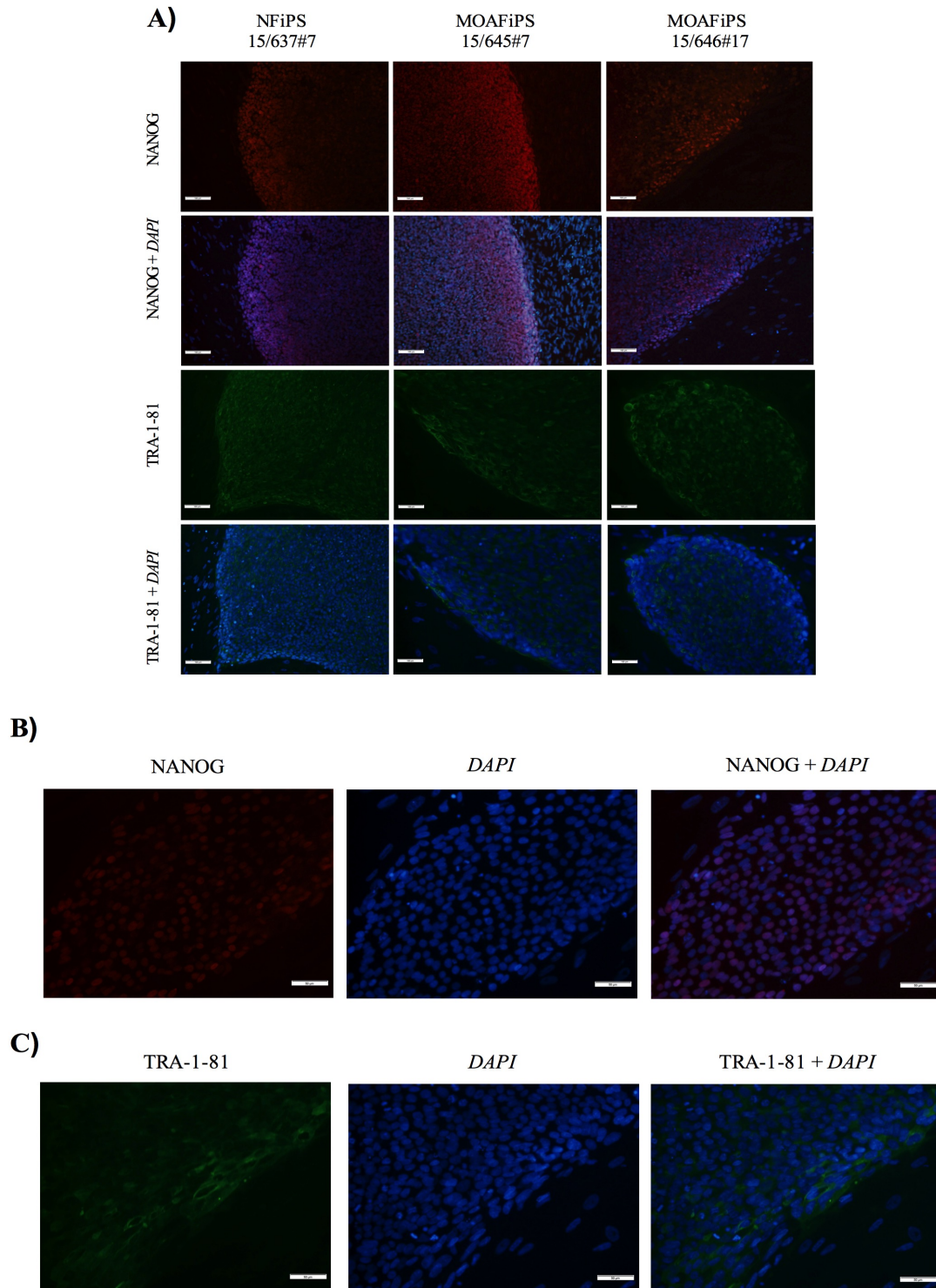
#### **5.4. Análisis histológico de la diferenciación de las *iPSCs* hacia endodermo, mesodermo y ectodermo**

La técnica de la gota colgante o “*hanging drop*” permitió generar *EBs* después de 48 h en cultivo. Estos *EBs* se recogieron de manera independiente y se estimuló su diferenciación hacia los tres linajes embrionarios manteniéndolos durante 21 días en medios de diferenciación específicos.

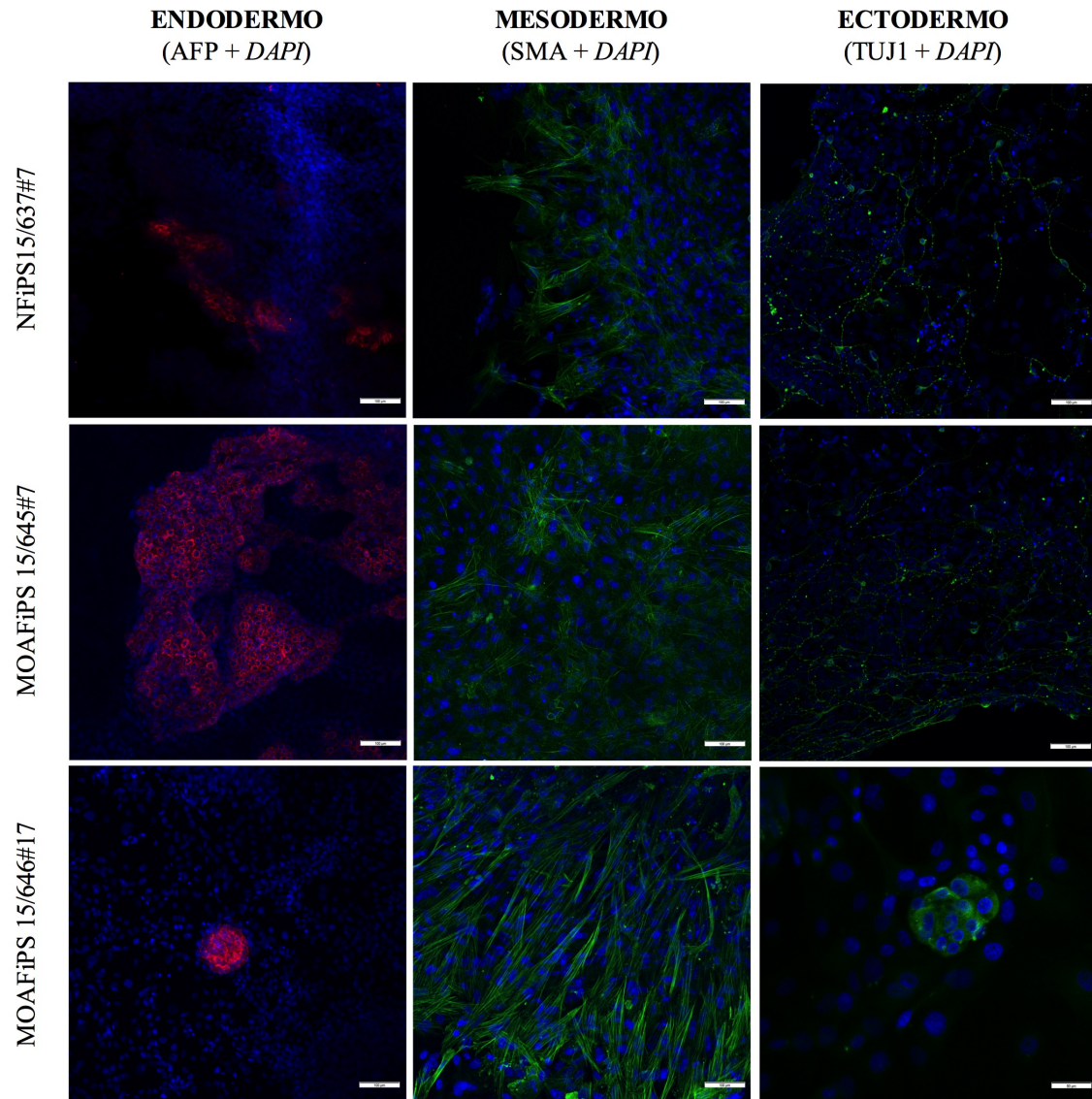
Tras la primera semana en cultivo, se observaron poblaciones de células heterogéneas que brotaban y crecían a partir de los *EBs*. Transcurridos 21 días, se confirmó el potencial de diferenciación de las *iPSCs* mediante la detección basada en inmunofluorescencia del marcador de endodermo AFP, el marcador de mesodermo SMA y el marcador de ectodermo TUJ1.

Tal y como se observa en la figura 27, el clon #7 de la donante sana (NFiPS 15/637#7) y el clon #7 de la paciente OA 1 (MOAFiPS 15/645#7) mostraron tinción positiva para el marcador AFP. La positividad para este marcador fue, aunque también positiva, ligeramente inferior en el clon #17 de la paciente OA 2 (MOAFiPS 15/646#17), mostrando así la capacidad de diferenciación endodérmica de los tres clones de *iPSCs*.

Además, se observó que los tres clones presentaban capacidad de diferenciación hacia mesodermo, tal y como lo demuestra la tinción positiva para SMA (Figura 27). Cabe destacar que, tras de 2-3 semanas de diferenciación mesodérmica *in vitro*, se observaron masas celulares que crecían a partir de los *EBs* de los tres clones y que latían espontáneamente en cultivo. De manera similar a la diferenciación endodérmica, el clon #7 de la donante sana (NFiPS 15/637#7) y el clon #7 de la paciente OA 1 (MOAFiPS 15/645#7) presentaron positividad para el marcador ectodérmico TUJ1, mientras que la fluorescencia del clon #17 de la paciente OA 2 (MOAFiPS 15/646#17) fue menor.



**Figura 26.** (A) Imágenes de inmunofluorescencia mostrando la presencia de los marcadores de pluripotencia NANOG (fluorescencia roja) y TRA-1-81 (fluorescencia verde) en las colonias de *iPSCs* de la donante sana (NFiPS 15/637#7), la paciente *OA* 1 (MOAFiPS 15/645#7) y la paciente *OA* 2 (MOAFiPS 15/646#17). Las preparaciones aparecen contrateñidas con *DAPI*. Escala 100  $\mu$ m. (B) Detalle de la localización nuclear de NANOG en una colonia representativa de *iPSCs*. Las preparaciones aparecen contrateñidas con *DAPI*. Escala 50  $\mu$ m. (C) Detalle de la localización citoplasmática de TRA-1-81 en una colonia representativa de *iPSCs*. Las preparaciones aparecen contrateñidas con *DAPI*. Escala 50  $\mu$ m.

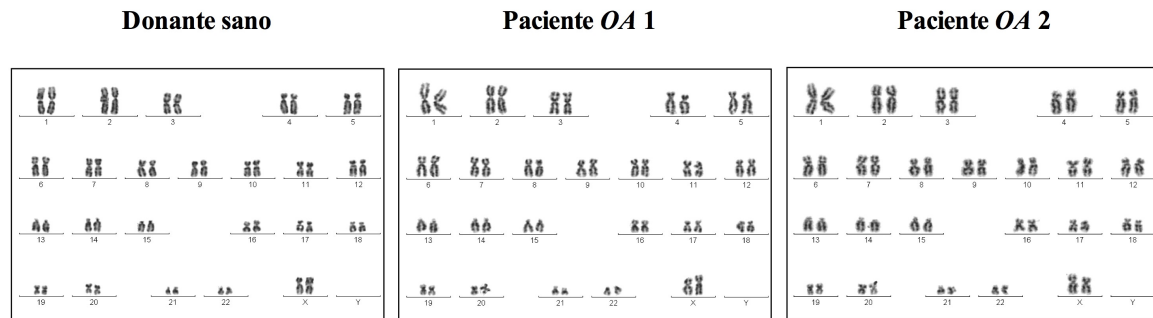


**Figura 27.** Imágenes de inmunofluorescencia que muestran la presencia del marcador de ecodermo (AFP, en rojo), el marcador de mesodermo (SMA, en verde) y el marcador de ectodermo (TUJ1, en verde) en las *iPSCs* de las tres donantes (NFiPS 15/637#7, MOAFiPS 15/645#7 y MOAFiPS 15/646#17) transcurridos 21 días de diferenciación. Las preparaciones se contratiñeron con *DAPI*. Escala 100  $\mu\text{m}$ . MOAFiPS 15/646#17, ectodermo, escala 50  $\mu\text{m}$ .

### 5.5. Análisis del cariotipo y autenticidad de las líneas de *iPSCs* generadas

Tanto los fibroblastos dermales parentales como los tres clones de *iPSCs* presentaron un cariotipo diploide 46, XX normal, sin anomalías detectables adquiridas en las tres líneas analizadas (Figura 28). Se confirmó además mediante análisis de “huella genética” o análisis de *STRs* que los clones de *iPSCs* derivaban de los fibroblastos de las dos pacientes con *OA* y la donante sana (Tabla VII).

Estos análisis, junto con las anteriores pruebas de caracterización, confirmaron la pluripotencia funcional de los tres clones de *iPSCs* y la ausencia de anomalías cromosómicas, permitiendo establecer así tres líneas de *iPSCs*: NFiPS 15/637#7, generada a partir de los fibroblastos de la donante sana; MOAFiPS 15/645#7, generada a partir de los fibroblastos de la paciente OA 1 y MOAFiPS 15/646#17, generada a partir de los fibroblastos de la paciente OA 2 (Tabla VIII).



**Figura 28.** Cariograma mostrando los resultados obtenidos tras el análisis de cariotipo mediante bandeo G, mostrando la dotación cromosómica diploide normal de las células (46, XX).

**Tabla VII.** Resultados tras el análisis de *STRs* de los fibroblastos dermales parentales y las líneas generadas de *iPSCs*, confirmando el origen de las mismas.

MUESTRA	MARCADOR									
	D5S818	D13S317	D7S820	D16S539	VWA	TH01	AMELOGENINA	TPOX	CSF	D21S11
Fibroblastos donante sano	11,13	10,13	9,11	11,12	18	7,9	X	8,12	11,12	29
NFiPS 15/637#7	11,13	10,13	9,11	11,12	18	7,9	X	8,12	11,12	29
Fibroblastos paciente OA 1	12	12,14	10,13	9,12	16	9,3,10	X	8	11,12	30
MOAFiPS 15/645#7	12	12,14	10,13	9,12	16	9,3,10	X	8	11,12	30
Fibroblastos paciente OA 2	11,13	8,11	8,12	10,11	14,16	8,9,3	X	8	10,11	30,33,2
MOAFiPS 15/646#17	11,13	8,11	8,12	10,11	14,16	8,9,3	X	8	10,11	30,33,2

**Tabla VIII.** Tabla resumen de las líneas de *iPSCs* generadas y características de cada una de ellas.

Línea celular	Sexo	Edad	Etnia	Artrosis (OA)
NFiPS 15/637#7	Mujer	44	Caucásica	No OA en rodilla, cadera ni manos.
MOAFiPS 15/645#7	Mujer	52	Caucásica	OAm no erosiva y rizartrosis unilateral derecha.
MOAFiPS 15/646#17	Mujer	76	Caucásica	OAm no erosiva y rizartrosis bilateral.

## 6. Estudio de polimorfismos de un solo nucleótido asociados a la artrosis de manos en las líneas de *iPSCs* generadas

Los resultados obtenidos tras el análisis de los *SNPs* asociados a la OAm en las tres

líneas de *iPSCs* generadas se recogen en la tabla IX.

Los resultados obtenidos tras el análisis de los *SNPs* seleccionados en las líneas de *iPSCs* se corresponden con los observados en los fibroblastos dermales parentales de los que se generó cada una de las líneas, mostrando así que la presencia de los distintos alelos en cada uno de los genes se mantuvo después de la reprogramación.

**Tabla IX.** Resultados obtenidos tras el estudio de polimorfismos de un solo nucleótido en los genes *A2BP1*, *ALDH1A2*, *GDF5*, *TNF-alpha*, *SMAD3*, *IL-4R*, *IL1-R1*, *MMP8* y *MATN3* mediante secuenciación Sanger.

Gen	SNP	Genotipo		
		NFiPS 15/637#7	MOAFiPS 15/645#7	MOAFiPS 15/646#17
<i>A2BP1</i>	rs716508	TT	CT	CT
<i>ALDH1A2</i>	rs3204689	CT	CC	CT
<i>GDF5</i>	rs143383	TT	CT	CT
<i>TNF-alpha</i>	rs1799724	CC	CC	CC
<i>SMAD3</i>	rs12901499	AA	GG	GG
<i>IL-4R</i>	rs1805013	CC	CC	CC
<i>IL-4R</i>	rs1805015	TT	TT	TT
<i>IL1-R1</i>	rs2287047	CC	CT	CT
<i>MMP8</i>	rs1940475	CC	-	TT
<i>MATN3</i>	rs77245812	CC	CC	CC

*SNP* (polimorfismo de un solo nucleótido), NFiPS15/637#7 (línea de *iPSCs* “sana”), MOAFiPS 15/645#7 (línea de *iPSCs* con artrosis de manos no erosiva y rizartrosis unilateral derecha), MOAFiPS 15/646#17 (línea de *iPSCs* con artrosis de manos no erosiva y rizartrosis bilateral).

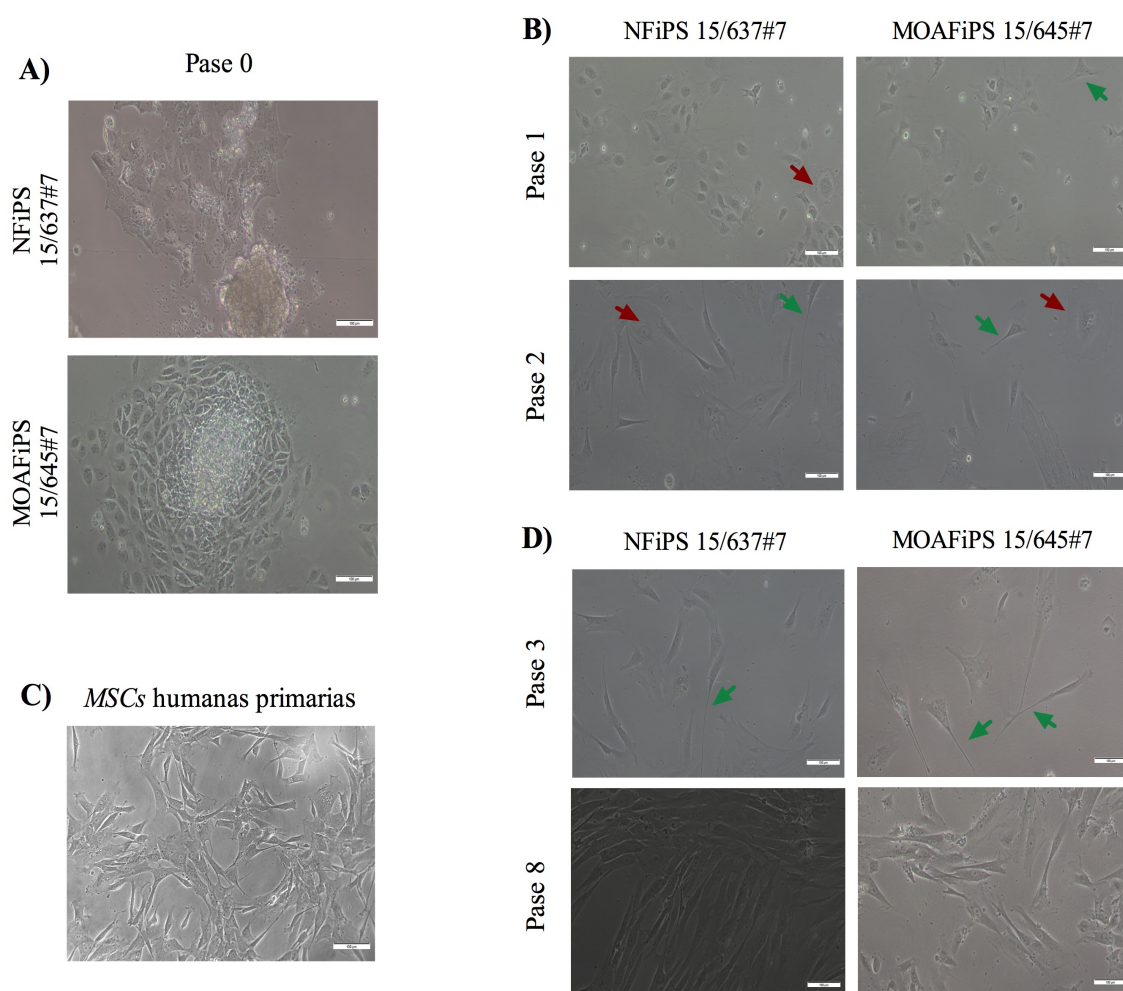
## 7. Diferenciación condrogénica *in vitro* de las *iPSCs* generadas a través del estadio de *MSCs*

### 7.1. Caracterización morfológica de las poblaciones de células similares a *MSCs*

Las poblaciones de células que crecieron a partir de los *EBs* de las líneas de *iPSCs* (Figura 29) presentaban una morfología inicialmente heterogénea, con células de distintas morfologías, desde alargada tipo fibroblasto (Figura 29A) hasta redondeada tipo macrófago (Figura 29B). Tras 3-4 subcultivos con tripsina, las poblaciones celulares adquirieron un aspecto homogéneo. Así, las células presentaron la típica morfología alargada fibroblástica, característica de las *MSCs* humanas (Figura 29C), con un citoplasma irregular y largas prolongaciones citoplasmáticas (Figura 29D).



Estas células presentaban además adherencia al plástico de cultivo.



**Figura 29.** Poblaciones de células similares a células mesenquimales estromales (*MSCs*) generadas a partir de las líneas de *iPSCs*. (A) Población de células creciendo a partir de los cuerpos embrionarios durante el proceso de diferenciación de las líneas de *iPSCs* hacia células similares a células mesenquimales estromales (*MSCs*). Escala 100  $\mu$ m (B) Población heterogénea de células obtenida tras el primer y el segundo pase de las líneas de *iPSCs* durante el proceso de diferenciación. Las flechas rojas señalan las células de morfología redondeada. Las flechas verdes señalan las células de morfología alargada. Escala 100  $\mu$ m. (C) Población de *MSCs* primarias humanas en cultivo utilizada como referencia para el análisis de la morfología de las poblaciones celulares obtenidas. (D) Población homogénea de células similares a *MSCs* tras el tercer y octavo pase. Las flechas verdes señalan las prolongaciones citoplasmáticas características de las *MSCs*. Escala 100  $\mu$ m.

## 7.2. Caracterización fenotípica de la población celular similar a *MSCs* obtenida

Las células similares a *MSCs* generadas se caracterizaron mediante citometría de flujo, estudiando la expresión de marcadores de superficie característicos de *MSCs*. El perfil de expresión de dichas poblaciones celulares se recoge en la tabla X. Las células similares a *MSCs* generadas a partir de la línea de *iPSCs* “sana” NFIPS 15/637#7 expresaron marcadores de superficies típicos de *MSCs*, mostrando un alto porcentaje de positividad para CD29 (99,39%), CD73 (84,26%), CD90 (99,75%). y CD105 (36,61%).

Por otro lado, las células similares a *MSCs* generadas a partir de la línea de *iPSCs* “artrósica” MOAFiPS 15/645#7 también expresaron marcadores de superficie típicos de *MSCs*, mostrando un alto porcentaje de positividad para el marcador CD29 (96,28%), CD73 (90,82%) y CD90 (81,7%). El porcentaje de positividad para el marcador CD105 fue menor, siendo este de un 1,5%.

**Tabla X.** Porcentajes de positividad para los marcadores característicos de células mesenquimales estromales (*MSCs*) en las células similares a *MSCs* derivadas de las líneas de *iPSCs* NFiPS 15/637#7 y MOAFiPS 15/645#7.

Línea celular	CD29	CD73	CD90	CD105
NFiPS 15/637#7	99,39%	84,26%	99,75%	36,61%
MOAFiPS 15/645#7	96,28%	90,82%	81,70%	1,50%

### 7.3. Diferenciación *in vitro* del conjunto celular similar a *MSCs* obtenido

#### 7.3.1. Diferenciación adipogénica

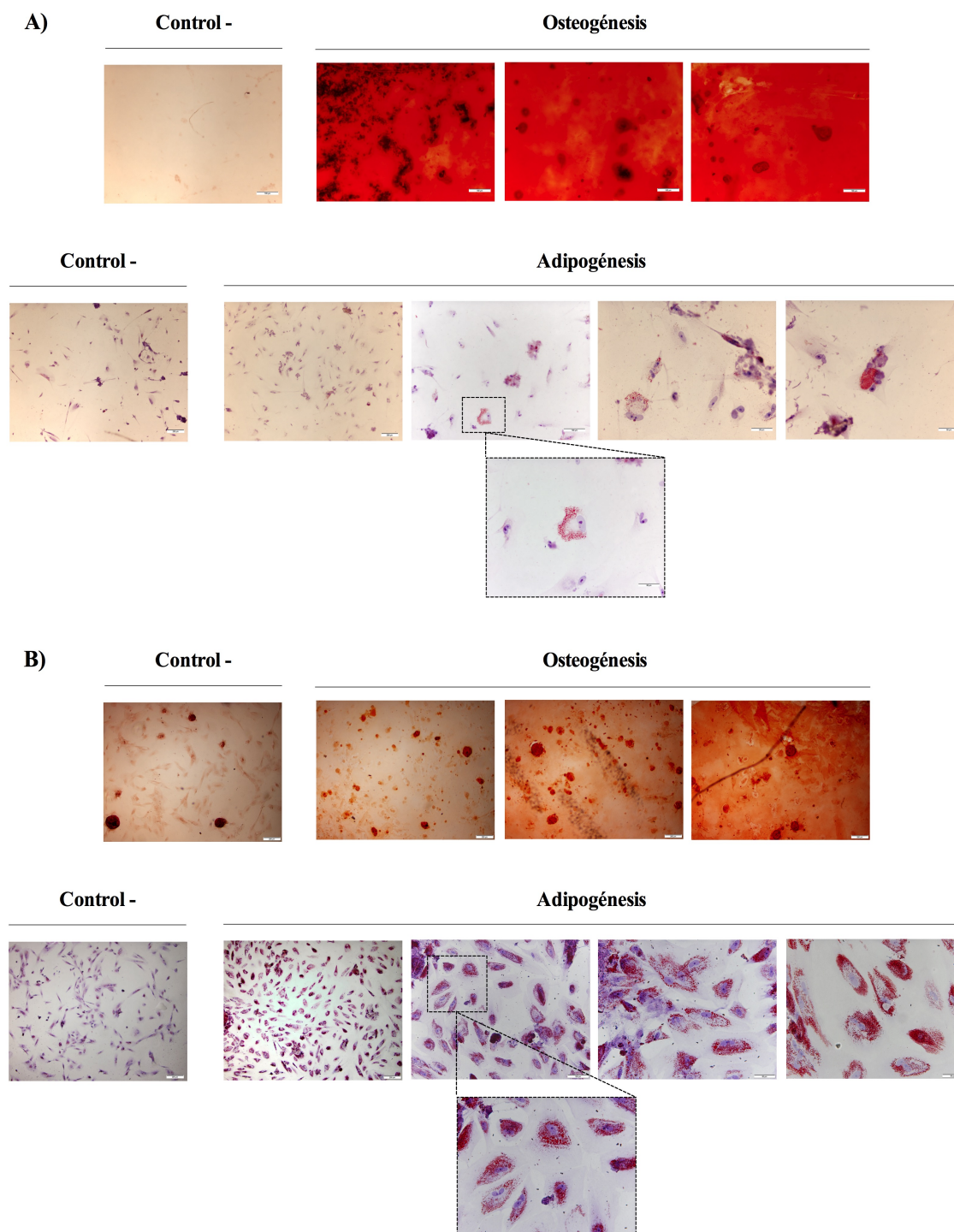
En la figura 30, se pueden observar en detalle las vacuolas lipídicas, en coloración rojo-naranja, que presentaron las células tras 21 días de diferenciación.

Respecto a la línea de *iPSCs* NFiPS 15/637#7, las células estimuladas presentaron un  $3,11\% \pm 4,06\%$  de positividad para la tinción *Oil-Red-O*, la cual permite valorar la existencia de vacuolas lipídicas propias de la diferenciación adipogénica. Esta positividad fue inferior a la de las células control o sin estimular ( $7,21\% \pm 4,01\%$ ) (Figura 31A).

En cuanto a la línea de *iPSCs* MOAFiPS 15/645#7, las células estimuladas con medio adipogénico mostraron mayor presencia de vacuolas positivas para la tinción con *Oil-Red-O* ( $3,11\% \pm 4,06\%$ ) que la línea NFiPS 15/637#7, siendo esta también superior a la de las células control o sin estimular, donde apenas hubo presencia de tinción ( $1,09\% \pm 1,19\%$ ) (Figura 31A).

#### 7.3.2. Diferenciación osteogénica

En la figura 30, se puede observar la tinción Rojo Alizarina realizada tras 21 días de diferenciación.

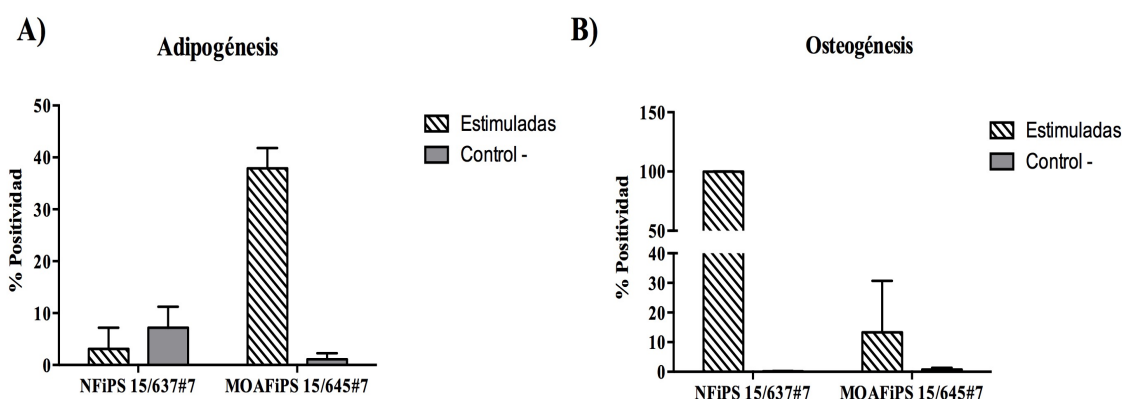


**Figura 30.** Diferenciación adipogénica y osteogénica de las células similares a mesenquimales estromales (MSCs). (A) Análisis histológico de la diferenciación adipogénica y osteogénica de la línea de *iPSCs* NFiPS 15/637#7 estimuladas durante 21 días con medios de diferenciación específicos (adipogénesis y osteogénesis) y cultivadas durante 21 días en medio EB (control -). (B) Análisis histológico de la diferenciación adipogénica y osteogénica de la línea de *iPSCs* MOAFiPS 15/645#7 estimuladas durante 21 días con medios de diferenciación específicos (adipogénesis y osteogénesis) y cultivadas durante 21 días en medio EB (control -).



Respecto a la línea de *iPSCs* NFiPS 15/637#7, las células estimuladas presentaron un  $99,87\% \pm 0,13\%$  de tinción con Rojo Alizarina, la cual permite valorar la presencia de depósitos de calcio extracelulares característicos de la diferenciación osteogénica. Las células sin estimular (control -) apenas presentaron positividad para esta tinción tres 21 días en cultivo ( $0,1\% \pm 0,08\%$ ) (Figura 31B).

En cuanto a la línea MOAFiPS 15/645#7, los valores de positividad para la tinción con Rojo Alizarina fueron de  $13,33\% \pm 17,34\%$ , cuando las células se estimularon durante 21 días en medio de diferenciación osteogénico, y de  $0,7\% \pm 0,56\%$  cuando las células se mantuvieron en medio EB (Figura 31B).



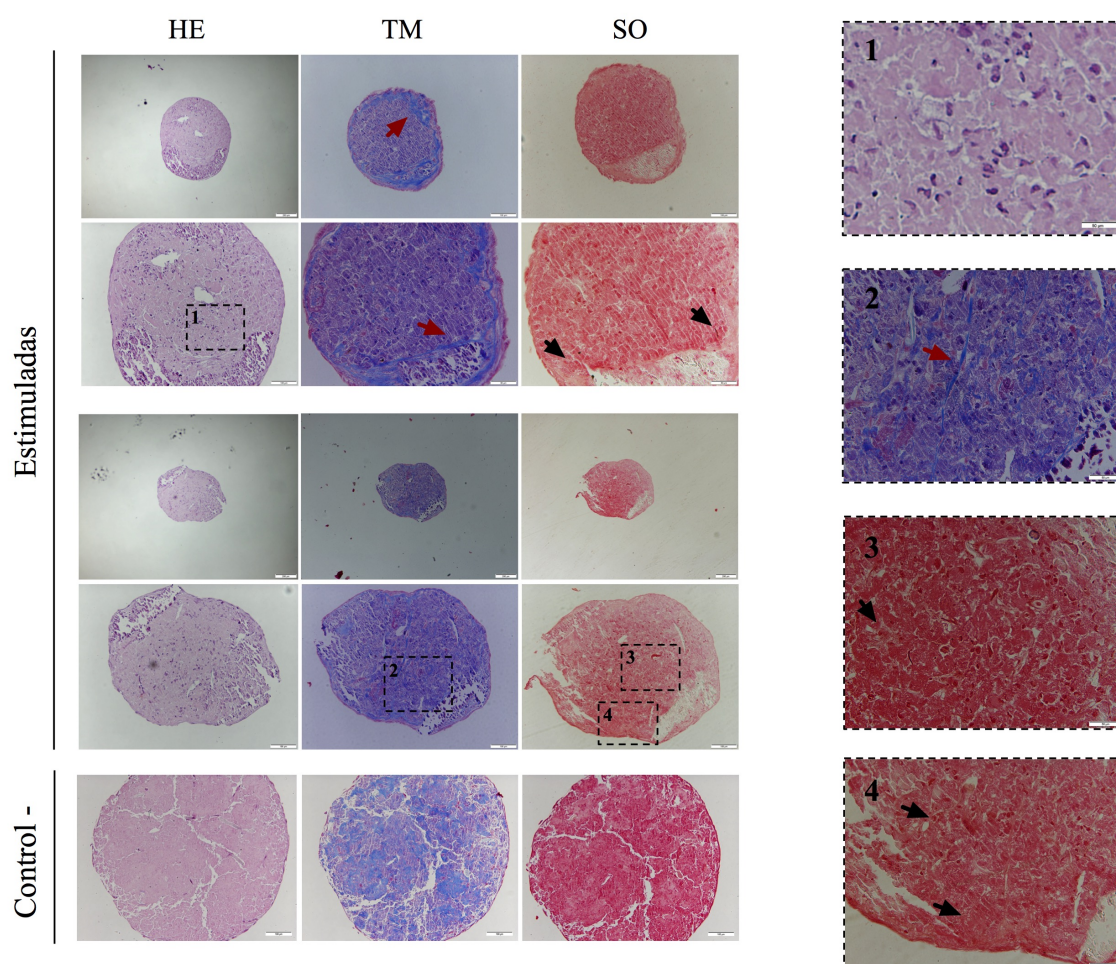
**Figura 31.** Cuantificación de la diferenciación adipogénica y osteogénica. (A) Gráfico de barras que representa el porcentaje de área teñida positivamente para la tinción *Oil-Red-O* en las células estimuladas y en las células control (control -) de las líneas de *iPSCs* NFiPS 15/637#7 y MOAFiPS 15/645#7. (B) Gráfico de barras que representa el porcentaje de área teñida positivamente para la tinción Rojo Alizarina en las células estimuladas y en las células control (control -) de las líneas de *iPSCs* NFiPS 15/637#7 y MOAFiPS 15/645#7. Los datos se representan como media  $\pm$  desviación estándar.

### 7.3.3. Diferenciación condrogénica

En lo que respecta a la línea de *iPSCs* NFiPS 15/637#7, la tinción HE permitió observar la estructura de las micromasas (Figura 32). En las micromasas estimuladas durante 21 días con medio condrogénico se pudieron observar células de aspecto heterogéneo, con una elevada variación en el tamaño de los núcleos y en el tamaño celular en general. Cabe destacar que en ninguno de los dos casos se observaron células con morfología condrocítica, es decir, células de aspecto redondeado embebidas en lagunas en la MEC. Esta tinción mostró además que la micromasa control presentaba un aspecto menos compacto y con menor celularidad que las micromasas estimuladas.

Con la tinción TM, se observó una gran cantidad de MEC rica en fibras de Col, evidenciadas en color azul. Estas fibras presentaron una distribución heterogénea en función de la micromasa estudiada, pudiendo localizarse en la zona central de la misma o bien hacia la periferia. Por su parte, con la tinción SO se observó cierta cantidad de PGs en la MEC de las micromasas, apareciendo éstos en coloración anaranjada. La micromasa no estimulada también presentó coloración azul cuando se realizó la tinción TM, mientras que prácticamente no se observó coloración naranja en la tinción SO.

### Condrogénesis NFiPS 15/637#7



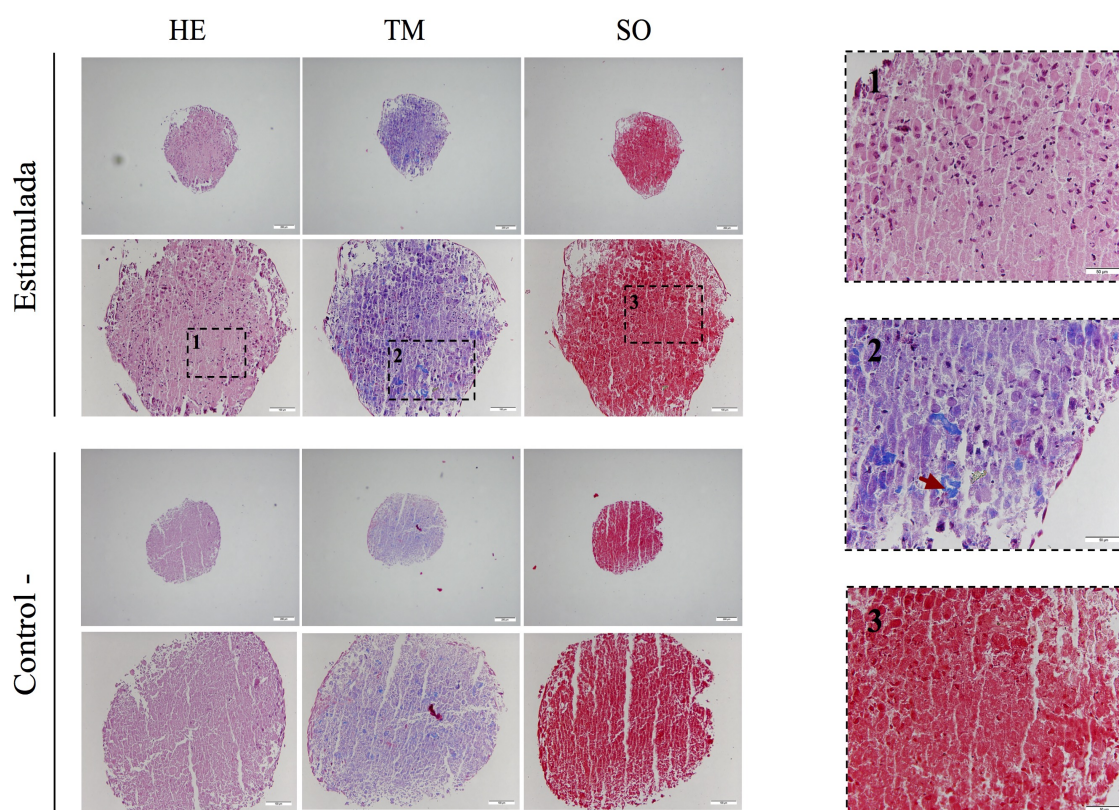
**Figura 32.** Análisis histológico de la diferenciación condrogénica en micromasas de la línea de *iPSCs* NFiPS 15/637#7. Tinción hematoxilina-eosina (HE), tricrómico de Masson (TM) y safranina O (SO). Las flechas rojas señalan las fibras de Col de la matriz extracelular en color azul. Las flechas negras señalan la tonalidad naranja que adquieren los PGs de la MEC.

Por su parte, las micromasas correspondientes a la línea de *iPSCs* MOAFiPS 15/645#7 (Figura 33) también presentaron la característica estructura redondeada de micromasa. La tinción HE permitió observar mayor celularidad en la micromasa estimulada que en

la micromasa control. Dichas células presentaban una distribución y morfología heterogéneas. Igual que en el caso anterior, la micromasa control presentó un aspecto menos compacto que la micromasa estimulada.

En cuanto a la tinción TM, la micromasa estimulada presentó zonas con coloración azulada en la MEC, mostrando presencia de cierta cantidad de Col, mientras que en la micromasa control, las zonas en coloración azul fueron más escasas. Finalmente, ni la micromasa estimulada ni la micromasa control presentaron coloración naranja, característica de los PGs, cuando se realizó la tinción SO.

### Condrogénesis MOAFiPS 15/645#7



**Figura 33.** Análisis histológico de la diferenciación condrogénica en micromasas de la línea de *iPSCs* MOAFiPS 15/645#7. Tinción hematoxilina-eosina (HE), tricrómico de Masson (TM) y safranina O (SO). La flecha roja señala las fibras de Col de la MEC en color azul.

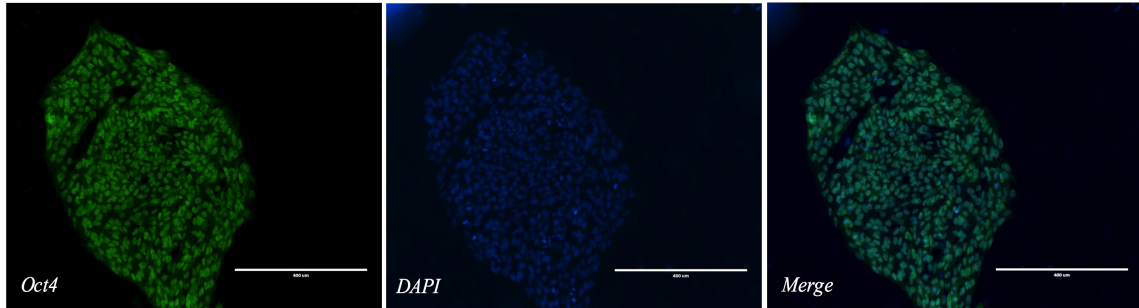


## **V. RESULTADOS DEL OBJETIVO 2**



### 1. Comprobación de la presencia del marcador de pluripotencia *Oct4*

La línea celular de *iPSCs* A2B presentó positividad para el marcador *Oct4*, el cual se fue detectado en el núcleo celular, coincidiendo con la localización de *DAPI* (Figura 34).

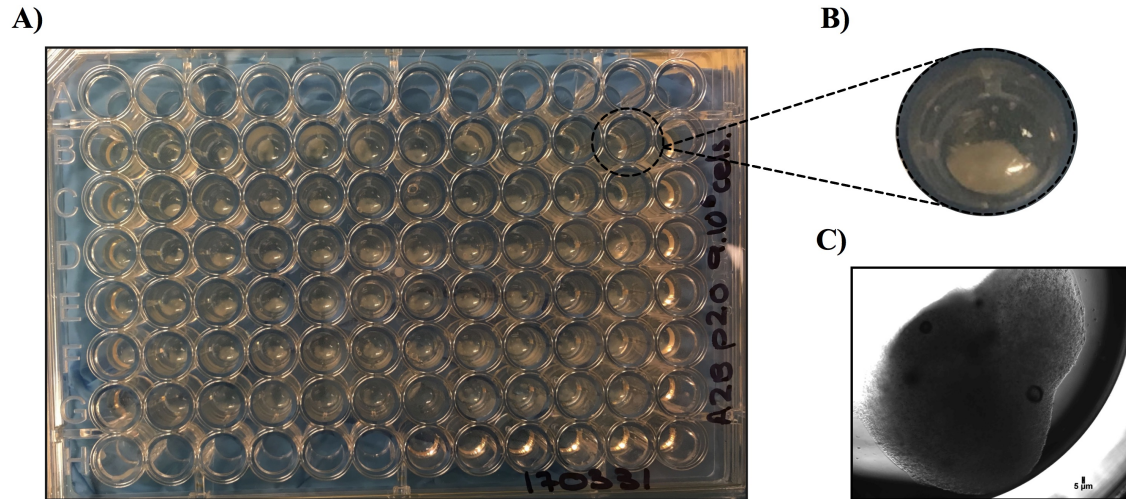


**Figura 34.** Imágenes de inmunofluorescencia de una colonia de células de la línea de *iPSCs* A2B mostrando la presencia del marcador de pluripotencia *Oct4*. Las preparaciones fueron contrateñidas con *DAPI*. *Oct4* presentó localización nuclear, coincidiendo con la localización de *DAPI* (*Merge*). Escala 400  $\mu\text{m}$ .

### 2. Impresión tridimensional de la línea celular A2B

La impresora de extrusión neumática *INKREDIBLE 3D bioprinter*, con las condiciones establecidas, permitió la impresión de 84 constructos (Figura 35A), compuestos por la mezcla de las células A2B y las biotintas de nanocelulosa, alginato y laminina. Dichos constructos fueron de poco grosor y presentaron la morfología redondeada deseada (Figura 35B), establecida previamente mediante la configuración de la impresora. Bajo el microscopio invertido, estos constructos presentaron un aspecto homogéneo, con los bordes redondeados y algunas burbujas en el interior de los mismos (Figura 35C).

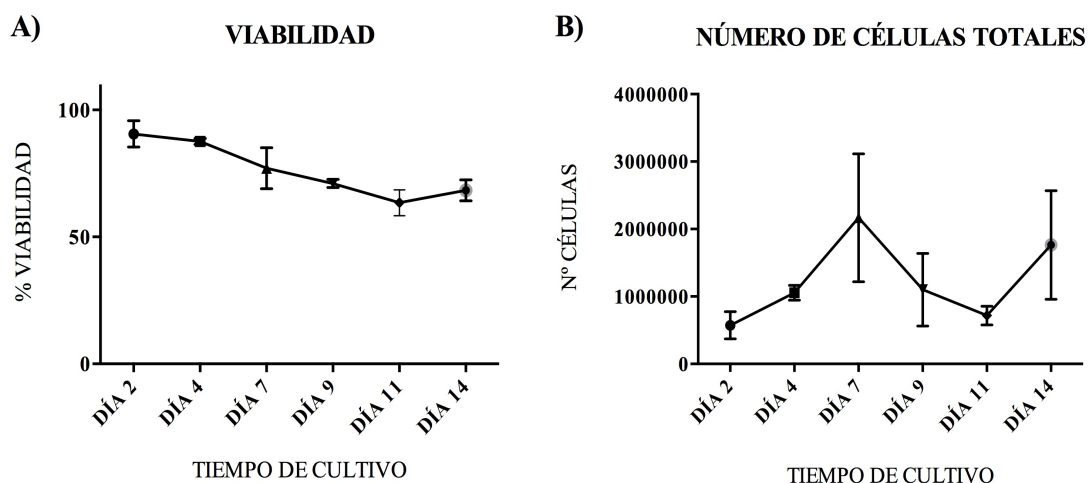
Aunque se imprimieron un total de 84 constructos, algunos de ellos se deshicieron en los pocillos durante el proceso de cultivo *in vitro* debido, fundamentalmente, a la ausencia de iones de  $\text{CaCl}_2$  en el medio de cultivo. Además, se utilizaron 25 constructos para llevar a punto el proceso de extracción de ARN. Así, finalmente se dispuso de un total de 25 constructos para los análisis de viabilidad celular y evaluación de la diferenciación condrogénica *in vitro* mediante técnicas histológicas e inmunohistoquímicas.



**Figura 35.** Constructos 3D tras la bioimpresión de las células A2B. (A) Imagen en la que se muestra la placa de 96 pocillos con los constructos compuestos por células y biotinta tras la impresión 3D de las células A2B. (B) Detalle de uno de los constructos. (C) Imagen tomada con microscopio invertido en el que se observa uno de los constructos 3D impresos. Escala 5 μm.

### 3. Estudio de la viabilidad celular en los constructos 3D cultivados *in vitro*

Se observó una elevada viabilidad a lo largo del tiempo en el interior de los constructos tras la impresión 3D de las células (Figura 36A). La primera medición de la viabilidad celular realizada 2 días después de la impresión 3D reveló un porcentaje de viabilidad del  $90,56\% \pm 5,2\%$ , que se mantuvo estable hasta día 7, momento en el que dichos valores disminuyeron hasta un  $77,03\% \pm 8,04\%$ . A los 14 días, el porcentaje de viabilidad celular en los constructos 3D era de un  $68,33\% \pm 4,14\%$ .



**Figura 36.** Análisis de la viabilidad y la proliferación de las células A2B tras el proceso de impresión 3D. (A) Gráfico en el que representa la viabilidad celular a lo largo del tiempo en el interior de los constructos tras la impresión 3D de las células A2B. (B) Gráfico en el que se representa el número total de células en el interior de los constructos 3D a lo largo del tiempo

En cuanto al número de células (Figura 36B), se observó crecimiento celular durante los primeros 7 días de cultivo, aumentando desde valores de  $5,73 \times 10^5$  células  $\pm 2 \times 10^5$  células, hasta las  $21,66 \times 10^5$  células  $\pm 9,47 \times 10^5$  células. A día 9, se observó una disminución en el número de células ( $11 \times 10^5$  células  $\pm 5,36 \times 10^5$  células) que se prolongó hasta el día 11 ( $7,17 \times 10^5$  células  $\pm 1,37 \times 10^5$  células), volviendo este a incrementarse a día 14 ( $17,64 \times 10^5$  células  $\pm 8,05 \times 10^5$  células).

#### **4. Evaluación de la diferenciación condrogénica *in vitro* de los constructos 3D**

##### **4.1. Evaluación macroscópica**

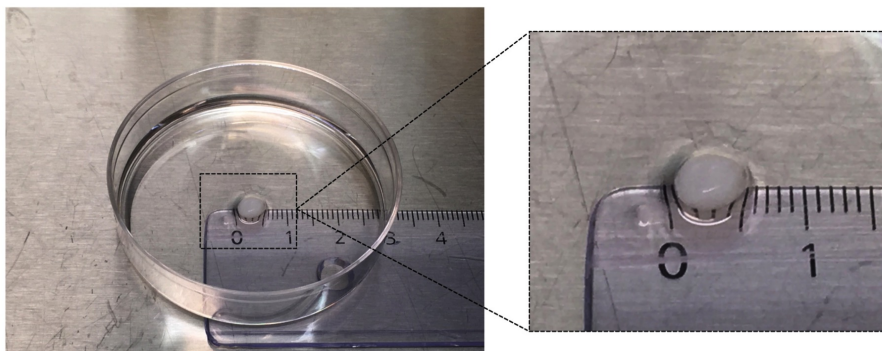
Tras seis semanas de cultivo en medio de diferenciación condrogénico se observó un aumento tanto del tamaño como del grosor de los constructos 3D, los cuales inicialmente eran de pequeño tamaño y presentaban poco grosor. Además, éstos adquirieron un aspecto compacto y una coloración más blanquecina y brillante (Figura 37A).

##### **4.2. Evaluación histológica**

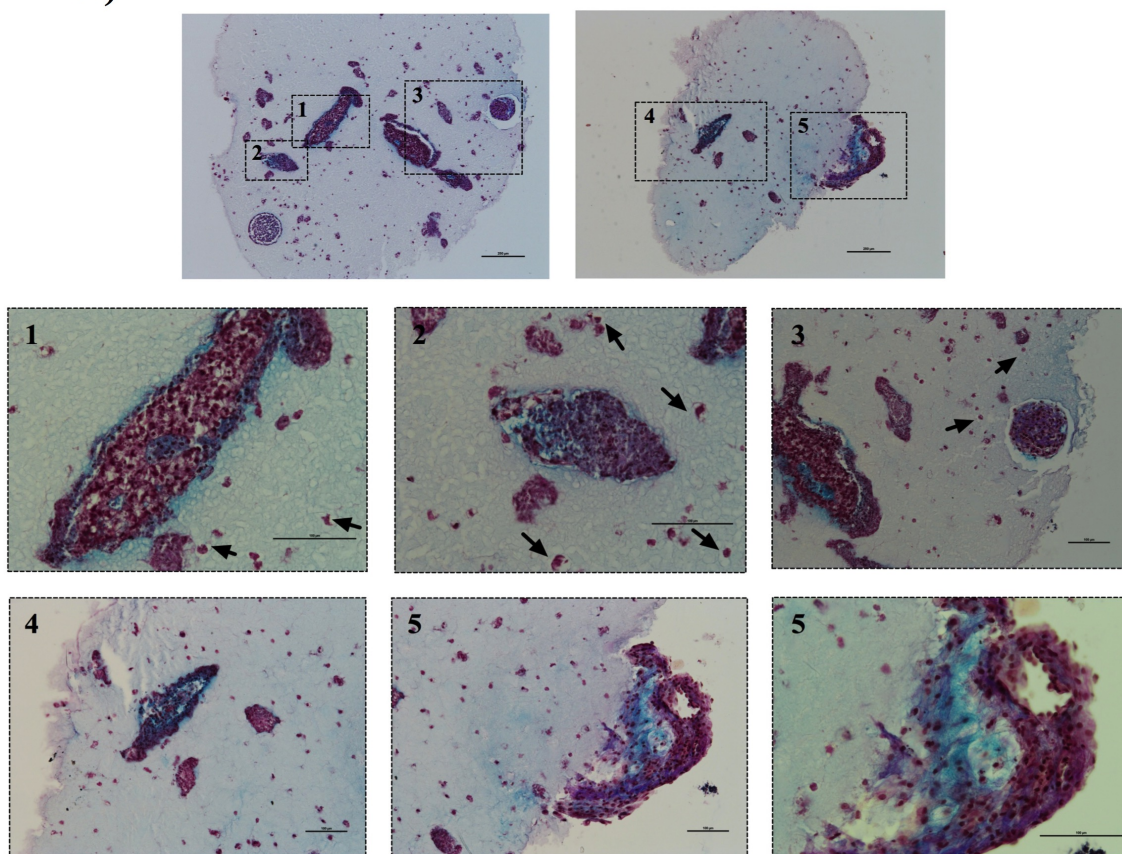
Con la tinción AA-vG se observó la estructura de los constructos cultivados durante 6 semanas en medio de diferenciación condrogénico (Figura 37B), observando en su interior abundantes células individuales, así como agrupaciones celulares distribuidas de manera heterogénea. Estas células presentaron morfología redondeada y poca cantidad de citoplasma; algunas de ellas se alojaban individualmente en espacios de la MEC similares a lagunas condrocitarias. Se observó además MEC producida por las propias células, rica en Col (color violeta) y PGs (color azul), especialmente en las zonas donde se encontraban las agrupaciones celulares. También se detectó una tenue coloración azul, correspondiente a PGs, a lo largo de todo el constructo.



A)



B)

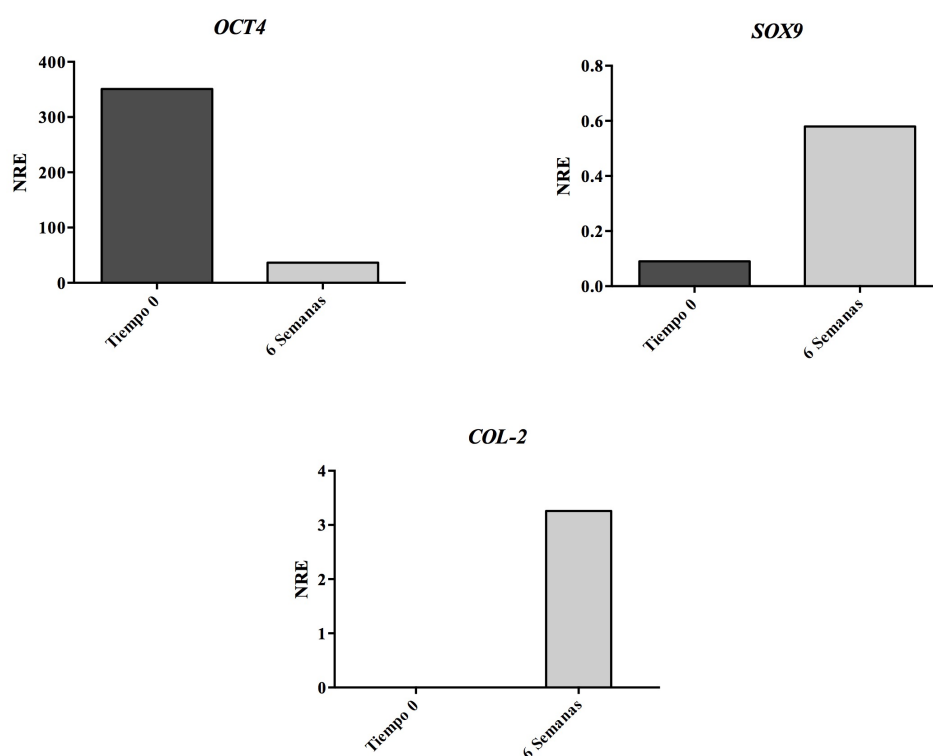


**Figura 37.** Observación macroscópica y análisis histológico de los constructos 3D tras seis semanas de diferenciación en medio condrogénico. (A) Constructo obtenido tras la impresión 3D de las *iPSCs* en la biotinta de nanocelulosa, laminina y alginato. (B) Imágenes de la tinción AA-vG en los constructos 3D. Las flechas negras señalan las células de morfología redondeada alojadas en cavidades de la MEC. Imágenes superiores, escala 250  $\mu\text{m}$ . Imágenes 1,2,3,4 y 5 detalle de la tinción; escala 100  $\mu\text{m}$ .

### 4.3. Evaluación molecular

Los análisis moleculares (Figura 38) mostraron altos NRE del marcador de pluripotencia *OCT4* en los constructos 3D antes de comenzar con el protocolo de diferenciación (tiempo 0). Sin embargo, los niveles relativos de expresión de *SOX9* a tiempo 0 fueron bajos y no se detectó expresión de *COL-2*.

Tras seis semanas de diferenciación de los constructos 3D en medio condrogénico, se detectó un incremento en los NRE de los genes característicos de la diferenciación condrogénica *COL-2* y *SOX9*, mientras que la expresión del marcador de pluripotencia *OCT4* disminuyó notablemente.



**Figura 38.** Análisis molecular de la diferenciación condrogénica de los constructos 3D. Gráficos de barras en los que se representan los niveles relativos de expresión (NRE) de los genes *OCT4*, *SOX9* y *COL-2* en las células en el interior de los constructos 3D antes (tiempo 0) y después de 6 semanas de diferenciación en medio condrogénico (6 Semanas).

## **VI. DISCUSIÓN**



***iPSCs* como herramienta para el estudio de la artrosis de manos**

Las articulaciones de los huesos de la mano constituyen el lugar más comúnmente afectado por la *OA*, la cual provoca dolor, rigidez, limitación funcional y, con ello, incapacidad para realizar actividades de la vida diaria (23). A pesar de ser una enfermedad altamente incapacitante y con una alta prevalencia, todavía se desconocen las bases moleculares que conducen al desarrollo de la *OAm* (33). Uno de los principales obstáculos para su investigación es el escaso número de muestras disponibles para llevar a cabo los estudios y la ausencia de modelos animales de la enfermedad (23).

Los modelos celulares *in vitro* son herramientas importantes para dilucidar los mecanismos moleculares y las rutas que intervienen en la *OAm*. Los condrocitos primarios, las líneas celulares inmortalizadas y las *MSCs* se emplean comúnmente como modelos *in vitro* de *OA* (26). Sin embargo, la utilización de estos tipos celulares presenta varias limitaciones, como la pérdida de fenotipo y el potencial de diferenciación después de varios pases o la difícil obtención de las células, entre otros (101, 123). Cabe destacar la dificultad a la hora de obtener controles apropiados, ya que los condrocitos articulares humanos sanos son difíciles de obtener debido a consideraciones éticas (26).

En este sentido, las *iPSCs* proporcionan una fuente de células que pueden proliferar indefinidamente en cultivo sin perder sus características y con capacidad para diferenciarse, bajo el estímulo adecuado, hacia cualquier tipo celular del organismo (122). Así, la utilización de *iPSCs* para desarrollar modelos *in vitro* de *OAm* permitiría disponer de células de interés para explorar más a fondo los mecanismos moleculares y las rutas que intervienen en la fisiología y fisiopatología de las articulaciones.

Este estudio describe, por primera vez, la generación de dos líneas de *iPSCs* a partir de fibroblastos dermales de pacientes con *OAm* (MOAFiPS 15/645#7 y MOAFiPS 15/646#17), así como una línea de *iPSCs* “sana” (NFiPS 15/637#7), que puede utilizarse como control en futuras investigaciones. Además, en estas líneas se ha estudiado la presencia de variaciones en la secuencia de distintos genes que desempeñan papeles importantes en la etiopatogenia de la *OAm* y se ha evaluado la capacidad de estas líneas para diferenciarse condrogénicamente.

---

### ***Proceso de reprogramación celular***

Los fibroblastos dermales son una fuente celular accesible con alta capacidad proliferativa y, por lo tanto, se pueden obtener grandes cantidades de células autólogas a partir de pequeñas poblaciones iniciales aisladas de forma mínimamente invasiva (122). Es por ello que en el presente estudio se generaron líneas de *iPSCs* mediante la reprogramación de fibroblastos dermales.

El tiempo transcurrido desde la obtención de las biopsias de piel hasta que se obtuvo un número suficiente de células para llevar a cabo los análisis y la reprogramación celular (dos semanas) coincide con el de otros estudios en el que aislaron fibroblastos a partir de biopsias de piel (64). Además, y contrariamente a otros estudios en los que las células aisladas de los donantes se reprograman inmediatamente después de su obtención (143, 144), en el presente proyecto se llevó a cabo una caracterización celular analizando marcadores característicos de fibroblastos (*Col-1*, *Fgrf4* y *Vim*), con la que se demostró el aislamiento exitoso de fibroblastos dermales de las tres donantes mediante el uso de la técnica de cultivo de explantes (145).

El proceso de reprogramación para generar *iPSCs* se llevó a cabo mediante la transducción de fibroblastos dermales de las pacientes *OA* y la donante sana con vectores modificados del *SV* que portaban los factores de reprogramación. El *SV* se transcribe en el citoplasma, permitiendo la eliminación del virus de las células huésped conforme éstas son subcultivadas (62, 146). Por el contrario, los vectores retrovirales o lentivirales pueden producir mutaciones por inserción y aberración cromosómica debido a su integración en el genoma del huésped (48, 71, 72, 146). Cuando se analizó mediante *qRT-PCR* el perfil de expresión de los clones aislados, no se detectó presencia de *SV*, ni expresión de los vectores que portaban los factores, lo que muestra la generación de tres líneas *iPSCs* de "huella cero" o "*foot-print free iPSCs*".

En cuanto a los factores de transcripción utilizados para llevar a cabo el proceso de reprogramación celular, en este estudio se han empleado los cuatro factores identificados inicialmente en el año 2006 por Takahashi y Yamanaka: *Oct4*, *Sox2*, *Klf4* y *c-Myc* (48). Aunque numerosos estudios han testado distintas combinaciones de factores para inducir la pluripotencia de células somáticas, esta combinación de factores sigue siendo la más utilizada y la que ha logrado las mayores eficiencias de reprogramación (68, 69), aún teniendo en cuenta que dichas eficiencias son, por lo

general, bajas (147). Es importante destacar que el hecho de haber utilizado vectores del *SV*, por tratarse de un método que mantiene la eficiencia del proceso teniendo en cuenta la seguridad de las líneas celulares generadas, hizo depender de un kit comercial y, con ello, no existió la posibilidad de probar nuevas combinaciones de factores para realizar el proceso de reprogramación.

Como se mencionó anteriormente, una limitación importante a la hora de inducir la pluripotencia es la baja eficiencia del proceso (63, 148). En este caso, se obtuvo una eficiencia de reprogramación de 0,2%-1,18%, resultado que coincide con otros estudios en los que se utilizan vectores de *SV* obteniendo eficiencias de 0,1%-1% (86, 87). A pesar de que son eficiencias muy bajas, cabe destacar que la eficiencia de reprogramación no es un indicativo de la calidad de las líneas de *iPSCs* generadas. De hecho, todo lo que se necesita es un solo clon de *iPSCs* de buena calidad de cada paciente (142).

#### ***Cultivo de las iPSCs en sistema libre de células alimentadoras o feeders***

A pesar de que la reprogramación celular se trata de un proceso conceptualmente sencillo, existen numerosas variables que hay que tener en cuenta con el fin de obtener *iPSCs* de calidad y de un modo reproducible. Entre estas variables destacan las condiciones de cultivo utilizadas para mantener y expandir las líneas celulares (61).

Determinadas pruebas y aplicaciones de las *iPSCs* requieren de cultivos libres de células alimentadoras o *feeders* (89). En el presente estudio, el proceso de adaptación de las células *iPSCs* al sistema libre de *feeders* requirió de la realización de varias pruebas, utilizando distintas combinaciones de matrices y medios de cultivo. La mayoría de las combinaciones utilizadas no permitían mantener la pluripotencia de las células ni llevar a cabo su expansión *in vitro*. Esta dificultad observada a la hora de realizar el proceso de adaptación concuerda con estudios que sugieren que dicho proceso puede resultar especialmente dañino para las células, sobre todo en el caso de líneas sensibles (90).

Se ha sugerido que la adición al medio de cultivo de pequeñas moléculas que aumenten la supervivencia celular facilita la expansión y el cultivo de las *iPSCs* (149). En concordancia con estos estudios, se observó que la adición al medio de cultivo de moléculas como *Rock inhibitor* o el suplemento celular Revitacell™, mejoraba en algunos casos la adherencia de las células al plástico de los frascos de cultivos y su

supervivencia. Sin embargo, en algunos sistemas de cultivo, como por ejemplo la combinación de Matrigel® con el medio E8, se observaron colonias con zonas diferenciadas que, en ocasiones, formaron *EBs* espontáneos. Así, aunque estas moléculas promueven la recuperación de las células después del pase, también pueden facilitar que células parcialmente diferenciadas proliferen en cultivo (61), por lo que su utilización debería restringirse a casos puntuales y ante necesidades experimentales.

En los últimos años, se han desarrollado distintas matrices para el cultivo de *iPSCs* en ausencia de células alimentadoras, siendo Matrigel® una de las más utilizadas. Esta matriz contiene Col-1 y Col de tipo IV (Col-IV), laminina-111, entactina, heparán sulfato, metaloproteasas de matriz (*matrix metalloproteinases*, *MMP*) y distintos factores de crecimiento y compuestos químicos. Se trata de un producto extraído de células de sarcoma de ratón y, por ello, no está químicamente definido (150). Matrigel® ha demostrado ser una alternativa útil que permite el cultivo estable de células madre pluripotentes humanas (151) y la generación de *iPSCs* humanas sin células alimentadoras (152). A pesar de los buenos resultados publicados, en nuestro trabajo sólo se logró adaptar uno de los clones de *iPSCs* utilizando esta matriz junto con medio condicionado de células *MEF*. Dado que sólo se pudo adaptar el clon #H y que dicho clon no fue seleccionado como candidato para establecer la línea de *iPSCs*, se descartó este sistema de cultivo libre de *feeders*. En futuros experimentos sería interesante testar la combinación de Matrigel® y el medio de cultivo comercial mTeSR1 (*StemCell Technologies*, Canadá), puesto que es la combinación más utilizada y la que ha mostrado mejores resultados (153).

Se testaron además otras matrices como son la vitronectina y el Geltrex®. La vitronectina recombinante humana es un sustrato definido que permite la auto renovación de *PSCs* a través de la adhesión con la integrina  $\alpha V\beta 5$  (153). Por su parte, Geltrex® es una matriz muy similar a Matrigel®, ya que ambos se obtienen de células de sarcoma de ratón y, como tales, tienen estructuras y composiciones muy similares (154). Ambos sustratos se utilizaron en combinación con el medio de cultivo comercial Essential 8, ya que se ha demostrado que ambas combinaciones permiten la expansión de las *iPSCs* durante más de 10 pases, manteniendo la pluripotencia de las células y en ausencia de alteraciones cromosómicas (153-155). Sin embargo, ninguno de estos sistemas de cultivo permitió la adaptación de las células *iPSCs* al cultivo libre de células *feeders*. Tampoco se obtuvieron buenos resultados cuando se utilizó la matriz de



Geltrex™ en combinación con el medio de cultivo StemFlex y el suplemento Revitacell™, a pesar de que algunos estudios han sugerido que esta combinación permite el crecimiento de las células *iPSCs* en ausencia de *feeders* incluso cuando se disocian las células (*single-cell passaging*) (156). Estos resultados ilustran que, en ocasiones, el proceso de adaptación de las células puede ser especialmente dañino y, por ello, el protocolo de adaptación debe ajustarse en función de la línea celular utilizada (90).

El sistema de cultivo DEF-CS™ se ha propuesto como un medio robusto para la expansión eficiente de *iPSCs* en un entorno definido y sin necesidad de células alimentadoras. Este sistema permitió la adaptación al cultivo libre de *feeders* de un total de cuatro clones, proporcionando mejores resultados que los sistemas de cultivo anteriormente descritos. Estos resultados coinciden con otros estudios publicados en los que también se utiliza el sistema DEF-CS™ para pasar las líneas de *iPSCs* de un sistema con *feeders* a uno de cultivo libre de células *feeder* (131, 142, 157). Sin embargo, el resto de clones aislados o no se adherían al plástico de los frascos de cultivo o no presentaban la morfología deseada, creciendo en monocapa. Estas diferencias entre los clones de las distintas líneas podrían tener una base genética o epigenética. Se ha sugerido que existen variaciones de este tipo entre líneas de *iPSCs*, entre diferentes clones, entre diferentes subcultivos de la misma línea de *iPSCs* e incluso entre diferentes poblaciones en un pase concreto de la misma línea de *iPSCs*, las cuales pueden ser adquiridas en las diferentes fases del proceso de generación y mantenimiento de las *iPSCs* (158). Dichas variaciones podrían afectar la susceptibilidad y capacidad de supervivencia de las *iPSCs* en los diferentes sistemas de cultivo. Esto sugiere la necesidad de realizar más experimentos con los que profundizar en la base subyacente a estas diferencias observadas.

Existen cada vez más estudios que demuestran que distintas isoformas específicas de laminina, expresadas en embriones tras la implantación, pueden desempeñar un papel importante en el mantenimiento a largo plazo de los cultivos de *iPSCs* (159, 160). Concretamente, la laminina recombinante humana 521 en combinación con medios de cultivo específicos ha proporcionado buenos resultados a la hora de mantener y diferenciar cultivos de *iPSCs* (159-163). En nuestro estudio, la utilización de una matriz de laminina recombinante humana 521 en combinación con el medio de cultivo StemFlex posibilitó la adaptación de cinco clones de *iPSCs*. Se ha sugerido que la

combinación de esta matriz con este medio de cultivo constituye una alternativa efectiva para la adaptación de líneas celulares especialmente sensibles o difíciles de cultivar (159), lo que apoyaría los resultados observados en este trabajo. Además, las *iPSCs* humanas, así como las *ESCs* humanas, presentan baja supervivencia cuando se realizan los subcultivos disociando las colonias y pasándolas como células individuales. Así, normalmente se requieren varios subcultivos realizados de manera mecánica antes de poder utilizar métodos enzimáticos (61). En este caso, tras tres pases manuales, las células se pudieron subcultivar enzimáticamente, lo que facilitó la expansión y el manejo de las líneas.

### ***Caracterización de las líneas celulares generadas***

Cuando se generan nuevas líneas de *iPSCs* es extremadamente importante realizar una caracterización exhaustiva de las mismas, con el fin de describir las poblaciones celulares, probar su pluripotencia funcional y detectar anomalías que podrían afectar al comportamiento y la seguridad de las células (94).

En este estudio, se ha realizado un panel de ensayos de acuerdo a las recomendaciones de las autoridades españolas competentes (Comisión de Seguimiento y Control de la Donación de Células y Tejidos Humanos del ISCIII y el BNLC), demostrando que las células presentan un cariotipo normal, sin inserciones ni deleciones adquiridas durante el proceso de reprogramación.

La morfología de las líneas de *iPSCs* resultó idéntica a las *ESCs* y presentaron además actividad fosfatasa alcalina, enzima propuesta como el marcador de pluripotencia más robusto en las *ESCs* humanas que presentan morfología adecuada (139). Se observó que no solo las colonias que surgieron inmediatamente después de la reprogramación presentaban dicha actividad, sino que también las líneas NFiPS 15/637#7, MOAFiPS 15/645#7 y MOAFiPS 15/646#17 mostraban actividad de esta enzima tras la expansión clonal. Sin embargo, dado que no se ha demostrado que todas las células que presentan actividad fosfatasa alcalina sean *PSCs*, debe evaluarse también la expresión de distintos marcadores de pluripotencia, así como la capacidad de diferenciación hacia endodermo, mesodermo y ectodermo (37).

En este sentido, las líneas de *iPSCs* mostraron un perfil de expresión génica similar a las *ESCs*, con altos NRE de los genes asociados a la pluripotencia *OCT4*, *SOX2*, *CRIPTO* y

*NANOG*. Estos genes no fueron detectados en los fibroblastos parentales. *OCT4*, *SOX2* y *NANOG* codifican para los denominados “factores de transcripción *core*”, descritos como los factores más importantes para mantener el estado pluripotente de las *ESCs* (67). Por su parte *CRIPTO* codifica para una proteína extracelular que está implicada en la ruta de señalización de *Nodal*, resultando fundamental para regular el desarrollo embrionario temprano y para mantener el estado indiferenciado de las *ESCs* (164). Así, el perfil de expresión de las líneas de *iPSCs* generadas en este estudio muestra la reversión del estado diferenciado de los fibroblastos dermales parentales hacia un estado pluripotente, similar al de las *ESCs*.

Los NRE de *KLF4*, sin embargo, fueron mayores en los fibroblastos dermales de las tres donantes, lo que podría ser un indicativo de que dicha expresión en las *iPSCs* era anormalmente baja. Existen estudios que han descrito resultados similares (139), aunque es importante destacar que en la mayoría de ellos no analizan los NRE en las células somáticas de partida. El factor de transcripción *Klf4* mantiene la capacidad de autorrenovación de las *iPSCs* mediante su cooperación con *c-Myc*. En las *iPSCs*, existe un equilibrio entre estos dos factores, en el que *Klf4* suprime la apoptosis inducida por *c-Myc*, y *c-Myc* neutraliza el efecto citostático de *Klf4*, manteniendo así la inmortalidad de las células *iPSCs* (77). En este sentido, se observó que los NRE de *CMYC* endógenos también eran mayores en los fibroblastos que en la mayoría de los clones de *iPSCs* aislados, lo que podría explicar estos resultados. Finalmente, dado que las líneas generadas cumplieron con todos los criterios para el establecimiento de líneas de *iPSCs*, estos NRE no parecen afectar a las propiedades de las líneas generadas. Algunos autores sostienen, además, que los elevados NRE de *KLF4* y *CMYC* en las células somáticas podrían estar relacionados con un estado epigenético y transcripcional favorable para la reprogramación (139).

La pluripotencia de las líneas de *iPSCs* NFIPS 15/637#7, MOAFIPS 15/645#7 y MOAFIPS 15/646#17 se demostró también mediante técnicas de inmunofluorescencia, detectando la presencia del marcador de pluripotencia *NANOG* y el antígeno de superficie específico de *ESCs* TRA1-81. Una vez comprobada la presencia de estos marcadores, el siguiente paso en el proceso de caracterización consistió en evaluar si las *iPSCs* podían diferenciarse hacia células derivadas de las tres capas germinales del embrión: endodermo, mesodermo y ectodermo. Esta evaluación funcional se llevó a cabo *in vitro* mediante la formación de *EBs*, los cuales consisten en agregados

tridimensionales de células que crecen en suspensión y que simulan el desarrollo embrionario *in vivo* (165, 166).

Existen distintos métodos para formar *EBs*, entre los que se incluyen el cultivo en suspensión en placas Petri, la técnica de la gota colgante o la utilización de placas con micropocillos de fondo cónico/redondo (167). En el presente estudio se seleccionó el método de la gota colgante o “*hanging-drop*” puesto que permite controlar el tamaño y la forma de los *EBs* generados, manteniendo así la reproducibilidad del proceso. Las células *iPSCs* de las tres donantes fueron capaces de diferenciarse hacia células de las tres capas germinales embrionarias. Sin embargo, la línea MOAFiPS 15/646#17 presentó una menor eficiencia de diferenciación hacia endodermo y ectodermo que las otras dos líneas celulares, al menos en base a la expresión de los marcadores AFP y TUJ1. Esta diferencia observada entre las líneas de *iPSCs* podría explicarse debido a la edad de la paciente, ya que la línea MOAFiPS 15/646#17 procede de fibroblastos de la paciente con más edad. Sin embargo, existen estudios que han demostrado que la edad de los donantes parece no afectar a la funcionalidad de las *iPSCs* (168). Otra posible explicación podría tener su base en la epigenética. Estudios recientes sostienen que las diferencias en la accesibilidad de la cromatina a nivel de los genes asociados a cada uno de los linajes, podría influir de forma significativa en la capacidad de diferenciación de las células (169).

### ***Modelo in vitro de la artrosis de manos***

La *OAm* se considera una enfermedad multifactorial (23) y, por ello, todavía existe mucha controversia acerca de su posible “modelado” *in vitro*. Hasta la fecha, la mayoría de los estudios que han utilizado *iPSCs* como modelo de enfermedad o para llevar a cabo el testado de nuevos fármacos y compuestos se han centrado en enfermedades monogénicas como la displasia esquelética (170) o la osteocondritis disecante (118). Sin embargo, se ha destacado la utilidad de las *iPSCs* para modelar enfermedades complejas afectadas por antecedentes genéticos y modificaciones ambientales (116, 171).

La *OAm* presenta la mayor heredabilidad de todos los tipos de *OA*. Así, estudios genéticos podrían contribuir al conocimiento de su patogénesis (23). En este contexto, el análisis de *SNPs* se ha postulado como una herramienta prometedora en el estudio de la etiopatogenia de *OAm*, con numerosas investigaciones publicadas al respecto (33, 34,

172). En el presente estudio se ha analizado, en las líneas de *iPSCs* generadas, la presencia de variaciones en la secuencia de genes que desempeñan un papel en diferentes niveles de la articulación de la mano: *GDF5* y *SMAD3*, asociados con rutas de señalización de factores de crecimiento; *MATN3* y *MMP8*, que desempeñan distintas funciones en el mantenimiento de la integridad y la degradación de la MEC del cartílago respectivamente y *ALDH1A2*, *IL1-R1*, *IL-4R*, *TNF-alpha*, relacionados con el proceso inflamatorio (23, 173). Se han estudiado además variaciones descritas en el gen *A2BP1*, el cual también ha sido asociado con el riesgo y la progresión de la *OAm* (174).

Las líneas de *iPSCs* presentaron diferentes variaciones de secuencia en los genes estudiados. El *SNP* rs143383 está localizado en la región 5'-UTR del gen que codifica para *GDF5*, una proteína que se activa desde el estado embrionario para inducir la condensación mesenquimal y su posterior condrogénesis (175). Se observó que las líneas de *iPSCs* “artrósicas” MOAFiPS 15/645#7 y MOAFiPS 15/646#17 presentaban la combinación alélica CT, mientras que la línea “sana” NFIPS 15/637#7 fue homocigota TT. La presencia del alelo T, tanto en homocigosis como en heterocigosis, se asocia con una disminución de la expresión de *GDF5* (176). Se ha demostrado que *GDF5* en el cartílago articular humano inhibe la expresión de enzimas degradadoras del cartílago articular al tiempo que estimula la expresión de enzimas anabólicas (175, 177), lo que podría explicar que el *SNP* rs143383 se considere un factor de riesgo para el desarrollo de *OA*. No obstante, estudios de análisis de genoma completo realizados y validados en varias cohortes de pacientes sugieren que el riesgo de desarrollar *OA* asociado a la variante rs143383 sólo es consistente en poblaciones con *OA* de rodilla y, eventualmente, en poblaciones con *OA* de cadera (34, 176, 178). A pesar de que la relación entre estas variaciones en la secuencia de *GDF5* con la *OAm* todavía no está clara, contar con líneas de *iPSCs* que presenten la variante de interés puede ayudar a comprender el papel de este *SNP* en la patogénesis de la *OAm*. Por otro lado, sería interesante profundizar en el estudio de las características de la línea de *iPSCs* “sana” dado que, a pesar de contener el alelo de riesgo T, no ha desarrollado la enfermedad.

El gen *SMAD3* codifica para el miembro 3 de la familia *SMAD*, un mensajero intracelular clave en la ruta de señalización del *TGF-β*, el cual tiene importantes efectos anabólicos sobre los condrocitos del cartílago articular (179). Debido al papel fundamental de este mensajero en el mantenimiento de la integridad del cartílago articular, se decidió evaluar la presencia del *SNP* rs12901499 en las líneas de *iPSCs*

generadas, a pesar de que las asociaciones estadísticamente significativas se han encontrado en cohortes de pacientes con *OA* de rodilla, de cadera o *OA* generalizada, pero no *OAm*. En estos estudios la presencia del alelo G se asocia con mayor riesgo de padecer *OA* en poblaciones caucásicas y asiáticas (179-183). En concordancia con estos resultados, se observó que las líneas de *iPSCs* de *OAm* eran homocigotas para la variante de riesgo (GG), mientras que la línea “sana” era homocigota para el alelo A (AA). Se ha descrito que alteraciones en el gen *SMAD3* podrían conducir a una maduración acelerada de los condrocitos (184), desencadenar la producción de enzimas catabólicas (179) y conducir al desarrollo temprano de *OA* (185), sin embargo, todavía son necesarios más estudios que permitan identificar el papel exacto de este gen en el desarrollo de la *OA*. La presencia de la variante rs12901499 en las líneas de *iPSCs* generadas hacen de ellas una herramienta valiosa para profundizar en este campo de estudio.

*MATN3* es otro gen candidato interesante en el estudio de la *OA*. Este gen codifica para una proteína no colágena de la MEC, matrilin-3, y se expresa en el sistema esquelético en desarrollo, presentando un patrón de expresión más restringido al cartílago epifisario (186, 187). Matrilin-3 interacciona con proteínas de la MEC del cartílago como el *AGG*, el Col-II y el Col-IX contribuyendo a la estabilidad de la misma. Aunque todavía se desconoce su función precisa, existen variantes en el gen *MATN3* que pueden reducir su papel estabilizador en la MEC. En este sentido, Stefansson y colaboradores han sugerido que el *SNP* rs77245812, también denominado *SNP5*, provoca una substitución importante en la secuencia de aminoácidos de la proteína y que dicha alteración puede afectar a la estabilidad de la MEC del cartílago. Así, la presencia del alelo T parece contribuir al desarrollo tardío de *OA* especialmente en las articulaciones IDs y MCF (186). Sin embargo, otros estudios han reportado resultados contradictorios en otras poblaciones (187, 188). En el presente estudio, ninguna de las líneas de *iPSCs* resultó portadora del alelo de riesgo T. Estos resultados se encuentran en concordancia con estudios que sugieren que, en poblaciones caucásicas, el alelo ancestral C prevalece sobre el alelo T en más del 90% de los casos (188).

Un rasgo característico de la degeneración del cartílago en la *OA* es la destrucción de la MEC por diferentes *MMP* (173, 189). Aunque existen numerosas *MMP*, la *MMP8* parece desempeñar un papel fundamental en la *OA*, al provocar la ruptura de las fibras de Col-I, Col-II y Col-III. Además, se ha demostrado que los niveles de *MMP8* son

---

mayores en el cartílago de pacientes con *OA* que en los controles sanos (190). Se ha sugerido que el *SNP* rs1940475 podría presentar asociación con la *OA*, siendo la presencia del alelo C más común en los pacientes que en controles (173). Näkki y colaboradores llevaron a cabo un estudio de asociación en el que observaron mayor prevalencia del alelo C en una cohorte de pacientes con *OAm* bilateral severa (173). En el presente trabajo y, contrariamente a los estudios mencionados, la línea de *iPSCs* “artrósica” MOAFiPS 15/646#17 resultó ser homocigota para la variante T (TT), mientras que la línea “sana” presentaba el alelo C (CC). No obstante, cabe destacar que los estudios mencionados no han sido validados en otras cohortes de pacientes y que la significación obtenida en estos estudios es, por lo general, baja. Por lo tanto, sería interesante profundizar en el papel de esta variante en el desarrollo de *OAm* con el fin de comprobar si esta asociación es reproducible en otras cohortes.

En cuanto al gen *ALDH1A2*, la línea celular “artrósica” MOAFiPS 15/645#7 fue homocigótica para el alelo de riesgo C (CC), mientras que la línea celular “artrósica” MOAFiPS 15/646#17 y la línea “sana” NFiPS 15/37#7 fueron heterocigotas (CG). El gen *ALDH1A2* codifica para la retinaldehído deshidrogenasa 1 de la familia A2, una enzima que cataliza la síntesis de ácido retinoico (23, 191). Este hallazgo es biológicamente relevante, ya que esta molécula de señalización hormonal juega un papel esencial en el desarrollo embrionario y en el mantenimiento de tejidos adultos, entre los que se incluyen el cartílago y el hueso (191, 192). Además, se ha propuesto que la actividad de *ALDH1A2* sirve como marcador de condrocitos activos con producción enriquecida de Col-II en el cartílago articular adulto humano (193, 194). Las líneas de *iPSCs* “artrósicas” establecidas en el presente estudio fueron generadas a partir de pacientes con rizartrrosis. En este sentido, Zhu y colaboradores observaron que pacientes con *OA* severa en la base del pulgar presentaban menores niveles de la enzima *ALDH1A2* en el cartílago de la articulación afectada, y que dichos niveles bajos coincidían con la presencia del alelo de riesgo C (195). Así, el haber establecido líneas de *iPSCs* con diferentes combinaciones alélicas a nivel de este gen y que han sido generadas a partir de pacientes tanto *OA* como sanos, nos permite disponer de una herramienta de gran valor para estudiar el papel de esta variante en la patogénesis de la *OAm*.

Citoquinas proinflamatorias como *TNF-alpha*, interleukina 1 (*IL-1*) o interleukina 4 (*IL-4*) se consideran importantes mediadores en el proceso artrósico (196, 197). Se han descrito distintas variantes genéticas en el gen *TNF-alpha* que podrían desempeñar un papel importante en la etiología de la *OAm*. En la variante rs1799724, C se considera el alelo ancestral y T el alelo minoritario (196). En el presente estudio se observó que las líneas de *iPSCs* eran homocigotas CC, no presentando variaciones en la posición estudiada del gen *TNF-alpha*. Tampoco se detectaron variaciones en las posiciones estudiadas del gen *IL-4R*. Este gen codifica para el receptor de la *IL-4*, regulando la cascada de reacción de esta proteína. Las variantes rs1805013 y rs1805015 en el gen *IL-4R* se han asociado con una mayor susceptibilidad a padecer *OAm* no erosiva en poblaciones caucásicas (198). Por su parte, el gen *IL1-IR* codifica para el receptor de la *IL1*, modulando la respuesta inflamatoria asociada a la destrucción de la articulación durante la *OA* (199). Näkki y colaboradores analizaron la presencia de varios *SNPs* a nivel de este gen y observaron que la variante rs2287047 se asociaba con *OAm* bilateral severa en la población estudiada (172), aunque sus resultados todavía no han sido validados en otras poblaciones. En el presente trabajo, se observó que las líneas de *iPSCs* “artrósicas” presentaban variaciones a nivel del gen (CT) en comparación con la línea “sana” (CC). Estos resultados hacen de las líneas generadas una posible herramienta de utilidad a la hora de evaluar *in vitro* el papel de estas combinaciones alélicas en el desarrollo y progresión de la *OAm*.

Cuando se estudió la presencia de variaciones en el gen *A2BPI* en las líneas de *iPSCs* los resultados fueron contradictorios. Se ha sugerido que la presencia del alelo C tiene un efecto protector en la *OAm*, aunque se trata de estudios que no han sido replicados (174). Sorprendentemente, la línea celular “sana” NFiPS 15/637#7 resultó ser homocigótica TT, mientras que ambas líneas celulares “artrósicas” MOAFiPS 15/645#7 y MOAFiPS 15/646#17 presentaron el alelo C (CT). La variante rs716508 se encuentra en el intrón 1 del gen *A2BP*, el cual está involucrado en el desarrollo de distintas enfermedades neurodegenerativas (200, 201). Sin embargo, todavía existe controversia con respecto a la asociación entre el gen *A2BPI* y la *OA*. Algunos autores han propuesto que el mecanismo potencial de este gen en la *OAm* es a través de efectos en el hueso subcondral (174). No obstante, aún se necesitan más estudios para aclarar el mecanismo de acción y la implicación de este gen en la *OAm*.

Por lo tanto, en el presente estudio se han generado tres líneas de *iPSCs* que presentaban



variaciones en la secuencia a nivel de los siguientes genes: *GDF5*, *SMAD3*, *ALDH1A2* y *A2BPI*. Todos ellos genes de interés directamente implicados en la homeostasis del cartílago y el proceso artrósico (23, 174). Además, es importante señalar que se observaron los mismos resultados cuando se estudiaron estas variantes de secuencia en los fibroblastos dermales parentales, lo que demuestra que el proceso de reprogramación no afectó el fondo genético de las células. Así, estas líneas de *iPSCs* con diferentes combinaciones alélicas representan herramientas valiosas para estudiar el papel de los *SNPs* en la patogénesis de la *OAm*. Conocer la carga genética de las líneas generadas a nivel de distintos genes de interés para la *OAm* resulta tremendamente interesante, ya que podría facilitar la interpretación de los resultados obtenidos a la hora de modelar la enfermedad *in vitro*. Además, el contar con una línea celular “sana”, también caracterizada para las variantes alélicas anteriormente descritas, permitirá comparar resultados de un modo más sencillo y comprender el peso que tienen estas variantes en el desarrollo de la enfermedad. Por otro lado, resultaría interesante realizar estudios de modulación de los distintos genes analizados para comprobar el efecto que tienen en la condrogénesis de las *iPSCs*.

Este planteamiento no está exento de limitaciones. Dado que es la primera vez que se generan líneas de *iPSCs* a partir de pacientes con *OAm*, todavía es pronto para afirmar firmemente que es posible modelar la enfermedad a través de la tecnología *iPSCs*. Además, los estudios de asociación basados en *SNPs* se centran en utilizar los factores genéticos para hacer predicciones sobre quién está en riesgo y quién no, con una cierta probabilidad. Esto significa que presentar una variante de riesgo no implica que finalmente se desarrolle la enfermedad, así como es posible desarrollar la enfermedad aún no teniendo una variante de riesgo (35, 202).

No obstante, según Liu y colaboradores, el establecimiento de modelos de *OA* basados en *iPSCs* humanas puede acelerar la investigación sobre la patogénesis de la enfermedad y ser un paso significativo hacia posibles tratamientos, aunque sigue siendo necesario encontrar un fenotipo específico *in vitro* (116). Una vez generadas las líneas de *iPSCs* se espera que los experimentos realizados en adelante aumenten nuestro conocimiento sobre los mecanismos moleculares que subyacen a la *OAm* y proporcionen información útil y efectiva para desarrollar nuevas estrategias terapéuticas.

---

### Diferenciación condrogénica *in vitro* de las *iPSCs* generadas a través del estadio de *MSCs*

En los últimos años se han desarrollado numerosos protocolos para estimular la diferenciación condrogénica de las *iPSCs* (102). Entre todos los protocolos actualmente disponibles, el más utilizado ha sido la diferenciación a través de la inducción de células similares a *MSCs* (101). Este procedimiento se basa en la capacidad de las *MSCs* para diferenciarse en los linajes condrogénico, osteogénico y adipogénico (107, 108) y en que la condensación mesenquimal es un requisito previo para la inducción de condrogénesis durante la formación de cartílago embrionario (104).

Para establecer poblaciones similares a *MSCs* a partir de *iPSCs*, se han investigado distintas estrategias. En el presente estudio, la diferenciación de las líneas de *iPSCs* NFiPS 15/637#7 y MOAFiPS 15/645#7 hacia células similares a *MSCs* se llevó a cabo, al igual que otros autores, a través de la formación de *EBs*, seguido de sucesivos subcultivos de las células con tripsina (111, 112, 203). Coincidiendo con estos estudios, cultivando las células en medio de *MSCs* (*DMEM* 10%) y tras 3-4 subcultivos con tripsina, las poblaciones celulares procedentes de las dos líneas de *iPSCs* utilizadas, adquirieron la morfología fibroblástica característica de las *MSCs*.

Según la Sociedad Internacional de Terapia Celular (*International Society for Cellular Therapy*) además de una morfología determinada y adherencia al plástico de los frascos de cultivo, las *MSCs* deben presentar un perfil de marcadores de superficie característico, así como capacidad de diferenciación hacia los linajes adipogénico, osteogénico y condrogénico (107). Siguiendo dichas recomendaciones, en este trabajo se analizó mediante citometría de flujo el patrón de expresión de los marcadores CD29, CD73, CD90 y CD105, característicos de *MSCs* primarias humanas. Al igual que estudios previos de caracterización de células similares a *MSCs* obtenidas a partir de *iPSCs*, se observó que las células derivadas de ambas líneas presentaban alta positividad para los marcadores CD29 (112, 203-205), CD73 y CD90 (109-112, 203-205). En cuanto a la expresión de CD105 los resultados publicados en la bibliografía resultan contradictorios. Algunos autores detectaron elevados niveles de este marcador (109, 110, 112, 203) incluso observaron como estos niveles aumentaban tras el cultivo *in vitro* de las células similares a *MSCs* (205). Por otro lado, existen estudios en los que las células similares a *MSCs* presentaron niveles bajos del marcador CD105 (111, 204), en

concordancia con los resultados obtenidos en este trabajo. Se ha sugerido que la expresión de CD105 podría verse disminuida debido a la expansión *in vitro* de las células (206) o bien ser causado por condiciones de cultivo particulares (207).

La capacidad de diferenciación adipogénica de las células similares a *MSCs* derivadas de ambas líneas fue baja, coincidiendo con otros estudios en los que las células presentaban muy poca (205) o no presentaban capacidad de diferenciación adipogénica (204, 208). A pesar de que en este trabajo las células similares a *MSCs* presentaron cierta adipogénesis, las vacuolas lipídicas observadas en la línea NFiPS 15/637#7 fueron de menor tamaño que las observadas en la línea MOAFiPS 15/645#7. Estos resultados son similares a los obtenidos por otros autores en células similares a *MSCs* derivadas tanto de *iPSCs* (205) como derivadas de *ESCs* (209). A pesar de que se desconocen las causas por las que *iPSCs* y *ESCs* muestran menos adipogenicidad, se ha sugerido que distintos factores intrínsecos podrían afectar a la diferenciación adipogénica de estas células *in vitro*, como por ejemplo los métodos de obtención y cultivo, la pureza y homogeneidad de las poblaciones celulares, el tejido de origen e incluso variaciones entre clones (205).

En concordancia con otros estudios (109, 110, 204, 205, 208), la capacidad de diferenciación osteogénica de las células similares a *MSCs* derivadas de ambas líneas fue mayor que la capacidad de diferenciación adipogénica. Concretamente, las células derivadas de la línea “sana” NFiPS 15/637#7 presentaron mayor osteogénesis que las células derivadas de la línea “artrósica” MOAFiPS 15/645#7. Estos resultados podrían ser debidos a los niveles más bajos de CD90 y CD105 observados en la línea MOAFiPS 15/645#7 (210). Se ha demostrado que el marcador de superficie CD90 está asociado con células osteoprogenitoras (210-213). Por otro lado, numerosos estudios han observado que las células *MSCs* positivas para el marcador CD105 presentan mayor capacidad de diferenciación osteogénica que aquellas células que no expresan este marcador (214-217).

A pesar del gran potencial de las *iPSCs* para estudiar y tratar alteraciones en el cartílago, las investigaciones en este campo se han visto limitadas debido a la ineficiencia y a la complejidad de los actuales protocolos de diferenciación (110). Hasta la fecha, muy pocos estudios han reportado buenos resultados (121, 218, 219). En este trabajo, la capacidad de diferenciación condrogénica de las células similares a *MSCs* se testó

mediante la formación de micromasas, ya que se ha demostrado que esta estructura 3D facilita el contacto célula-célula y aumenta la producción de MEC (111, 142, 220). Las micromasas estimuladas de la línea “sana” NFIPS 15/637#7 presentaron mayor cantidad de colágeno y PG en la MEC que las micromasas estimuladas de la línea “artrósica” MOAFIPS 15/645#7. Aunque hasta la fecha no se han realizado estudios comparando la capacidad de diferenciación condrogénica entre líneas de *iPSCs* “artrósicas” y “sanas”, Murphy y colaboradores demostraron que las *MSCs* obtenidas a partir de pacientes con *OA*, presentaban menor capacidad de proliferación y menor potencial de diferenciación condrogénico que las *MSCs* de pacientes sanos (221). Además, otros autores mostraron que los condrocitos derivados de *iPSCs* generadas a partir de pacientes con osteocondritis disecante familiar, reflejaban cambios observados en la *OA* avanzada (118). Estos estudios junto con los resultados obtenidos en el presente trabajo demuestran el potencial de las *iPSCs* como herramienta para estudiar el comportamiento de los condrocitos artrósicos.

No obstante, es importante destacar que en ninguno de los casos se observaron células con morfología condrocítica, es decir, células de aspecto redondeado embebidas en lagunas en la MEC (222). Las células de las micromasas de ambas líneas presentaron un aspecto heterogéneo, lo que podría ser debido al protocolo de diferenciación vía *EBs*. Hay autores que sugieren que la formación de *EBs* genera poblaciones celulares heterogéneas con diferentes capacidades de diferenciación (110). El establecimiento de pasos de purificación a lo largo del protocolo de diferenciación ha sido un gran avance en los protocolos de diferenciación, tal y como lo confirman los resultados obtenidos por Craft *et al.* (219) y Yamashita *et al.* (121). Es por ello que sería interesante incorporar pasos de separación celular en futuros experimentos, con el fin de mejorar la eficiencia de la diferenciación condrogénica.

Por otro lado, se ha demostrado que el cultivo 3D y la adición de *TGF-β3* al medio de cultivo es fundamental para la diferenciación condrogénica de las *iPSC in vitro* (111). En este protocolo, además de cultivar las células a modo de micromasas, el medio de cultivo se suplementó con el factor de crecimiento *TGF-β3*. No obstante y en vista a los resultados obtenidos, sería interesante testar la adición de otros factores tales como *GDF5*, *BMPs* o dexametasona, los cuales se ha demostrado que promueven la diferenciación condrogénica (110, 111).

Las bases moleculares que conducen al desarrollo de la *OAm* todavía se desconocen (33) debido fundamentalmente al escaso número de muestras disponibles para llevar a cabo los estudios y la ausencia de modelos animales de la enfermedad (23). La información obtenida de *iPSCs* generadas a partir de pacientes con *OA* y su posterior diferenciación en tipos de células específicos relevantes para la enfermedad podría proporcionar información valiosa sobre la patogénesis de la *OA*. A pesar de que son necesarios más estudios que permitan aumentar el tamaño muestral y mejorar el protocolo de diferenciación empleado en el presente trabajo, los resultados obtenidos muestran como las células *iPSCs* pueden diferenciarse hacia el linaje condrogénico y que dicha diferenciación es distinta en la línea “sana” y en la línea “artrósica”. La identificación de genes expresados diferencialmente en estas líneas de *iPSCs* podría contribuir a una mayor comprensión de las características moleculares de la enfermedad, así como al descubrimiento de nuevas dianas terapéuticas. Por lo tanto, las líneas de *iPSCs* generadas en el presente trabajo constituyen una herramienta prometedora para la búsqueda de indicios sobre los defectos celulares y moleculares que causan la *OA*.

### **Impresión 3D de *iPSCs* como herramienta para la ingeniería tisular del cartílago**

El envejecimiento y las lesiones en el cartílago articular son las principales causas de la degeneración de este tejido. La avascularidad del cartílago y la baja actividad mitótica de los condrocitos limita la capacidad de reparación intrínseca del mismo (59). Así, la carga mecánica que incide diariamente sobre las articulaciones dañadas puede acelerar la degeneración focal del cartílago y dar lugar al desarrollo de *OA* (121, 123).

Aunque actualmente no existe un tratamiento efectivo para curar la *OA*, las nuevas terapias basadas en la medicina regenerativa y en la ingeniería tisular podrían suponer una solución para tratar de preservar, reparar y restaurar la integridad del cartílago articular (101). La bioimpresión permite la generación de constructos biológicos tridimensionales, que contienen células, factores de crecimiento y soportes, de una manera muy precisa. La alta precisión y el elevado rendimiento de estos sistemas los convierte en una técnica muy prometedora para generar neotejidos *in vitro* que imiten el microambiente humano observado *in vivo* (136).

En este trabajo, se ha llevado a cabo la impresión 3D de *iPSCs* utilizando biotintas de *NFC*, laminina y alginato, con el fin de generar *in vitro* un tejido similar al cartílago

---

articular humano. En los últimos años se han realizado estudios similares en los que utilizan la impresión 3D de distintas biotintas en combinación con condrocitos (134), *MSCs* (133) o ambos (135). Estas fuentes celulares presentan una serie de limitaciones ya que son difíciles de obtener y a menudo muestran cambios en su fenotipo y potencial de diferenciación después de varios subcultivos (123). Por el contrario, las *iPSCs* constituyen una fuente celular abundante, accesible y con capacidad de proliferar indefinidamente en cultivo sin perder sus características, por lo que constituyen un recurso atractivo para aplicaciones en ingeniería tisular (59).

Existen distintos tipos de impresoras 3D que pueden utilizarse en ingeniería tisular del cartílago, pero todas ellas utilizan biotintas capaces de mantener la estructura 3D de los constructos después de la impresión (133). En este trabajo, utilizando un hidrogel compuesto por una mezcla de *NFC*, laminina y alginato, se generaron constructos 3D que mantuvieron la forma redondeada deseada tras realizar el proceso de impresión y el subsecuente *cross-linking*. Estos resultados concuerdan con los obtenidos por otros autores, los cuales concluyen que los hidrogeles que contienen *NFC* y alginato presentan las propiedades ideales para mantener la viabilidad celular post-impresión y la estructura de los constructos (131, 133-135) y que las lamininas favorecen la adhesión de las células a la matriz (160, 223).

Aunque algunos constructos se disgregaron durante el cultivo *in vitro*, esto pudo ser debido a la ausencia de iones de  $\text{CaCl}_2$  en el medio de cultivo, iones utilizados durante el proceso de *cross-linking* y necesarios para mantener la estructura de los constructos a lo largo del tiempo (134). En futuros experimentos se estudiará la posibilidad de incorporar dichos iones a la composición del medio de cultivo para tratar de solventar este problema.

Estudios recientes han sugerido que el paso del conjunto biotinta-células a través de las jeringuillas de las impresoras puede provocar estrés celular y que este daño puede inducir muerte celular y cambios fenotípicos en las células tras la impresión (136). En este estudio se observó elevada viabilidad en el interior de los constructos tras la impresión de las células. Además, se observó como el número de células viables aumentaban a lo largo del tiempo durante la primera semana en cultivo. Estos resultados concuerdan con los obtenidos por otros estudios en los que se observaron que *iPSCs* y condrocitos humanos impresos en combinación con biotintas de nanocelulosa

mostraban viabilidades celulares del 70-80% después de siete días en cultivo (131, 134). Cabe destacar que la viabilidad de las células disminuyó de manera pronunciada al comenzar el protocolo de diferenciación condrogénica. Esta observación podría corresponderse con la muerte celular programada que tiene lugar tras la condensación mesenquimal durante la morfogénesis de las extremidades (224). Dado que el recuento de la viabilidad celular sólo se realizó durante las primeras dos semanas de cultivo, no se puede excluir que el número de células volviese a aumentar tras este episodio inicial de muerte celular.

Möller y colaboradores (135) llevaron a cabo un experimento de impresión 3D con *MSCs* utilizando densidades celulares de  $10 \times 10^6$  células/ml de biotinta, mientras que en el presente trabajo se utilizó una densidad de  $20 \times 10^6$  células/ml de biotinta. Existen estudios que demuestran que a la hora de llevar a cabo experimentos de diferenciación condrogénica son necesarias densidades celulares elevadas, incluso mayores de  $20 \times 10^6$  células/ml (225). Durante la embriogénesis del cartílago, las células condroprogenitoras se encuentran densamente empaquetadas y, por tanto, elevadas densidades celulares ayudarían a simular este estadio del desarrollo. Además, mayores densidades celulares facilitan los contactos célula-célula, previniendo la desdiferenciación y favoreciendo la formación de MEC (135).

Tras la impresión 3D de las *iPSCs* y su posterior diferenciación condrogénica *in vitro* se obtuvo un tejido de aspecto macroscópico similar al cartílago articular, resultados similares a los obtenidos por otros estudios *in vivo* en los que implantaban constructos 3D de condrocitos y biotintas de *NFC* en ratones desnudos (133). Además, en el análisis histológico se observó que estos constructos presentaban componentes característicos de la MEC del cartílago, tales como Col y PG. Estas moléculas se localizaban preferentemente en las zonas de agrupaciones celulares, volviendo a poner de manifiesto la necesidad de conseguir altas densidades celulares para estimular la formación de MEC, tal y como sostienen otros autores (135, 225).

La pluripotencia de las células A2B se comprobó antes de realizar el proceso de impresión mediante el estudio de la presencia del marcador *Oct4*. Una semana después de la impresión 3D las células mantenían el estado pluripotente, tal y como mostraron los NRE elevados del gen *OCT4*. Coincidiendo con estos resultados, Nguyen y colaboradores (131) observaron también NRE elevados de *Oct4* tras la impresión 3D de

*iPSCs*. La formación de un tejido similar al cartílago articular tras seis semanas de diferenciación se demostró además estudiando los NRE de genes característicos del cartílago articular, como *COL-2* y *SOX9*. Es importante destacar que los NRE de *OCT4*, aunque no fueron indetectables, se vieron disminuidos, un punto importante a tener en cuenta a la hora de implementar estos procedimientos en clínica, ya que las células no diferenciadas aumentarían el riesgo de formación de teratomas (131) y comprometerían así la seguridad de la técnica.

Este estudio, aunque prometedor, también presenta una serie de limitaciones. En primer lugar, los experimentos se realizaron utilizando una única línea de *iPSCs*, la línea celular A2B. Sería interesante por tanto realizar nuevos experimentos utilizando distintas líneas celulares, con el fin de comprobar la reproducibilidad de los resultados e incrementar además el tamaño muestral para posteriores análisis. En segundo lugar, el medio de diferenciación condrogénico utilizado se basó el medio publicado por Böstrom y colaboradores (142). A pesar de que tras 6 semanas de diferenciación se detectaron marcadores de condrocitos y componentes característicos de la MEC del cartílago, todavía se necesita más investigación para conseguir protocolos que permitan optimizar la diferenciación de las *iPSCs* y conseguir células comparables a los condrocitos humanos. En este sentido, determinar qué factores de crecimiento incluir o excluir en los medios de diferenciación, así como la concentración y el tiempo de administración de los mismos, resulta fundamental para mejorar este tipo de protocolos. Los constructos 3D impresos a gran escala, podrían suponer una herramienta para realizar la búsqueda de estos factores y analizar el papel de cada uno de ellos en la diferenciación condrogénica de las *iPSCs*. Finalmente, sería interesante estudiar las propiedades mecánicas de los constructos obtenidos tras el proceso de diferenciación, con el fin de comprobar si se asemejan o no a las características mecánicas del cartílago articular humano.

En resumen, este estudio demuestra que las células *iPSCs* pueden someterse a impresión 3D utilizando biotintas de *NCF*, laminina y alginato, y que las células contenidas en dichos constructos 3D pueden ser estimuladas para promover su diferenciación hacia condrocitos. Estos resultados podrían sentar las bases para establecer protocolos que permitan optimizar y mejorar la generación de neocartílago mediante ingeniería tisular, el cual podría ser utilizado en futuras terapias para tratar y reparar el cartílago articular dañado.

---



## **VII. CONCLUSIONES**



**Conclusiones relativas al objetivo 1:**

1. La reprogramación no integrativa es un procedimiento útil para la generación de líneas de *iPSCs* “artrósicas” y “sana” a partir de fibroblastos humanos.
2. Las tres líneas de *iPSCs* generadas cumplen los criterios morfológicos, moleculares y funcionales requeridos para demostrar la pluripotencia.
3. La reprogramación no integrativa utilizando el virus Sendai permite generar de manera exitosa líneas de *iPSCs* “artrósicas” y “sana” portadoras de diferentes polimorfismos de un solo nucleótido (*SNPs*).
4. Las líneas de *iPSCs* NFiPS 15/637#7 y MOAFiPS 15/645#7 pueden diferenciarse hacia células similares a mesenquimales estromales, con capacidad para diferenciarse hacia el linaje condrogénico.

**Conclusiones relativas al objetivo 2:**

1. Las biotintas compuestas por celulosa nanofibrilada, alginato y laminina permiten llevar a cabo la impresión tridimensional con la línea de *iPSCs* A2B.
2. La impresión tridimensional con biotintas compuestas por celulosa nanofibrilada, alginato y laminina e *iPSCs* es un método que permite mantener la viabilidad y la proliferación celular tras el proceso de impresión.
3. La diferenciación condrogénica de los constructos 3D obtenidos permite generar un tejido similar al cartílago articular.

**Conclusions related to objective 1:**

1. The performed non-integrating reprogramming is a useful procedure to generate “healthy” and “osteoarthritic” iPSC-lines from human fibroblasts.
2. The three generated iPSC-lines fulfil the morphological, phenotypic and functional requirements to be considered pluripotent cells.
3. The non-integrating reprogramming using Sendai virus enables the successful generation of “osteoarthritic” and “healthy” iPSC-lines carrying different single nucleotide polymorphisms (SNPs).
4. The iPSC-lines NFiPS 15/637#7 and MOAFiPS 15/645#7 are able to differentiate into MSC-like cells with capacity to differentiate towards the chondrogenic lineage.

**Conclusions related to objective 2:**

1. The bioink composed by nanofibrillated cellulose, alginate and laminin allows the 3D printing of the iPSC-line A2B.
2. The 3D printing of iPSCs in combination with nanofibrillated cellulose, alginate and laminin bioinks allows cell proliferation and keeps cell viability after the bioprinting process
3. Chondrogenic differentiation of the 3D printed constructs allows the *in vitro* generation of cartilage-like tissue.

## **VIII. BIBLIOGRAFÍA**



1. Gomoll AHM, T. The quality of healing: articular cartilage. *Wound Repair Regen.* 2014;22 Suppl 1:8.
2. Sophia Fox AJ, Bedi A, Rodeo SA. The basic science of articular cartilage: structure, composition, and function. *Sports health.* 2009;1(6):461-8.
3. Carballo CN, Y; Sekiya, I; Rodeo, S.A. Basic Science of Articular Cartilage. *Clinics in Sports Medicin.* 2017;36(3):12.
4. Mobasheri A, Kalamegam G, Musumeci G, Batt ME. Chondrocyte and mesenchymal stem cell-based therapies for cartilage repair in osteoarthritis and related orthopaedic conditions. *Maturitas.* 2014;78(3):188-98.
5. Chen S, Fu P, Wu H, Pei M. Meniscus, articular cartilage and nucleus pulposus: a comparative review of cartilage-like tissues in anatomy, development and function. *Cell and tissue research.* 2017;370(1):53-70.
6. Ng HNL, K.X; Shen Y.F. Articular Cartilage: Structure, Composition, Injuries and Repair. *JSM Bone and Joint Diseases.* 2017;1(2).
7. Steinert AF, Ghivizzani SC, Rethwilm A, Tuan RS, Evans CH, Noth U. Major biological obstacles for persistent cell-based regeneration of articular cartilage. *Arthritis research & therapy.* 2007;9(3):213.
8. Mayan MD, Gago-Fuentes R, Carpintero-Fernandez P, Fernandez-Puente P, Filgueira-Fernandez P, Goyanes N, et al. Articular chondrocyte network mediated by gap junctions: role in metabolic cartilage homeostasis. *Annals of the rheumatic diseases.* 2015;74(1):275-84.
9. Bhosale AM, Richardson JB. Articular cartilage: structure, injuries and review of management. *British medical bulletin.* 2008;87:77-95.
10. Schulz RM, Zscharnack M, Hanisch I, Geiling M, Hepp P, Bader A. Cartilage tissue engineering by collagen matrix associated bone marrow derived mesenchymal stem cells. *Bio-medical materials and engineering.* 2008;18(1 Suppl):S55-70.
11. Makris EA, Gomoll AH, Malizos KN, Hu JC, Athanasiou KA. Repair and tissue engineering techniques for articular cartilage. *Nature reviews Rheumatology.* 2015;11(1):21-34.
12. Man GS, Mologhianu G. Osteoarthritis pathogenesis - a complex process that involves the entire joint. *Journal of medicine and life.* 2014;7(1):37-41.
13. Kraus VB, Blanco FJ, Englund M, Karsdal MA, Lohmander LS. Call for standardized definitions of osteoarthritis and risk stratification for clinical trials and clinical use. *Osteoarthritis and cartilage.* 2015;23(8):1233-41.
14. Loeser RF, Goldring SR, Scanzello CR, Goldring MB. Osteoarthritis: a disease of the joint as an organ. *Arthritis and rheumatism.* 2012;64(6):1697-707.
15. Blanco-Garcia FJ. La artrosis y la aterosclerosis de la articulación. *Reumatología clínica.* 2018;14(5):3.
16. Kock L, van Donkelaar CC, Ito K. Tissue engineering of functional articular cartilage: the current status. *Cell and tissue research.* 2012;347(3):613-27.
17. Fernandez-Lopez JC, Laffon A, Blanco FJ, Carmona L, Group ES. Prevalence, risk factors, and impact of knee pain suggesting osteoarthritis in Spain. *Clinical and experimental rheumatology.*

2008;26(2):324-32.

18. Sakalauskiene G, Jauniskiene D. Osteoarthritis: etiology, epidemiology, impact on the individual and society and the main principles of management. *Medicina*. 2010;46(11):790-7.
19. Belmonte-Serrano MAB-F, J.; Lerma-Garrido, J. Artrosis. In: S.L. INEPA, editor. *Enfermedades Reumáticas - Actualización SVR II Edición: Sociedad Valenciana de Reumatología*; 2013. p. 24.
20. Loza E, Lopez-Gomez JM, Abasolo L, Maese J, Carmona L, Batlle-Gualda E, et al. Economic burden of knee and hip osteoarthritis in Spain. *Arthritis and rheumatism*. 2009;61(2):158-65.
21. Ramonda R, Frallonardo P, Musacchio E, Vio S, Punzi L. Joint and bone assessment in hand osteoarthritis. *Clinical rheumatology*. 2014;33(1):11-9.
22. Kloppenburg M, Stamm T, Watt I, Kainberger F, Cawston TE, Birrell FN, et al. Research in hand osteoarthritis: time for reappraisal and demand for new strategies. An opinion paper. *Annals of the rheumatic diseases*. 2007;66(9):1157-61.
23. Marshall M, Watt FE, Vincent TL, Dziedzic K. Hand osteoarthritis: clinical phenotypes, molecular mechanisms and disease management. *Nature reviews Rheumatology*. 2018;14(11):641-56.
24. Pereira D, Peleteiro B, Araujo J, Branco J, Santos RA, Ramos E. The effect of osteoarthritis definition on prevalence and incidence estimates: a systematic review. *Osteoarthritis and cartilage*. 2011;19(11):1270-85.
25. Feydy A, Pluot E, Guerini H, Drape JL. Osteoarthritis of the wrist and hand, and spine. *Radiologic clinics of North America*. 2009;47(4):723-59.
26. Thysen S, Luyten FP, Lories RJ. Targets, models and challenges in osteoarthritis research. *Disease models & mechanisms*. 2015;8(1):17-30.
27. Contreras-Blasco MA. Artrosis erosiva o inflamatoria: la gran desconocida. *Medicina Clínica*. 2007;129(7):280.
28. Williams WV, Cope R, Gaunt WD, Adelstein EH, Hoyt TS, Singh A, et al. Metacarpophalangeal arthropathy associated with manual labor (Missouri metacarpal syndrome). Clinical radiographic, and pathologic characteristics of an unusual degeneration process. *Arthritis and rheumatism*. 1987;30(12):1362-71.
29. Blanco-Garcia FJ. Aspectos básicos. In: IM&C M, editor. *Manual SER de la artrosis*2002.
30. Stecher RM. Heberden's nodes: the incidence of hypertrophic arthritis of the fingers. *New England Journal of Medicine*. 1940;222:8.
31. Spector TD, Cicuttini F, Baker J, Loughlin J, Hart D. Genetic influences on osteoarthritis in women: a twin study. *BMJ (Clinical research ed)*. 1996;312(7036):940-3.
32. Ishimori ML, Altman RD, Cohen MJ, Cui J, Guo X, Rotter JI, et al. Heritability patterns in hand osteoarthritis: the role of osteophytes. *Arthritis research & therapy*. 2010;12(5):R180.
33. Gabay O, Gabay C. Hand osteoarthritis: new insights. *Joint, bone, spine : revue du rhumatisme*. 2013;80(2):130-4.
34. Wang T, Liang Y, Li H, Li H, He Q, Xue Y, et al. Single Nucleotide Polymorphisms and Osteoarthritis: An Overview and a Meta-Analysis. *Medicine*. 2016;95(7):e2811.
35. Bush WS, Moore JH. Chapter 11: Genome-wide association studies. *PLoS computational biology*. 2012;8(12):e1002822.



- 
36. Kolios G, Moodley Y. Introduction to stem cells and regenerative medicine. *Respiration; international review of thoracic diseases*. 2013;85(1):3-10.
  37. Singh VK, Kalsan M, Kumar N, Saini A, Chandra R. Induced pluripotent stem cells: applications in regenerative medicine, disease modeling, and drug discovery. *Front Cell Dev Biol*. 2015;3:2.
  38. Qi SD, Smith PD, Choong PF. Nuclear reprogramming and induced pluripotent stem cells: a review for surgeons. *ANZ journal of surgery*. 2014;84(6):417-23.
  39. Hochedlinger K, Jaenisch R. Nuclear transplantation: lessons from frogs and mice. *Current opinion in cell biology*. 2002;14(6):741-8.
  40. Evans MJ, Kaufman MH. Establishment in culture of pluripotential cells from mouse embryos. *Nature*. 1981;292(5819):154-6.
  41. Thomson JA, Itskovitz-Eldor J, Shapiro SS, Waknitz MA, Swiergiel JJ, Marshall VS, et al. Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts. *Science*. 1998;282(5391):1145-7.
  42. Brons IG, Smithers LE, Trotter MW, Rugg-Gunn P, Sun B, Chuva de Sousa Lopes SM, et al. Derivation of pluripotent epiblast stem cells from mammalian embryos. *Nature*. 2007;448(7150):191-5.
  43. Tesar PJ, Chenoweth JG, Brook FA, Davies TJ, Evans EP, Mack DL, et al. New cell lines from mouse epiblast share defining features with human embryonic stem cells. *Nature*. 2007;448(7150):196-9.
  44. Nichols J, Smith A. The origin and identity of embryonic stem cells. *Development*. 2011;138(1):3-8.
  45. Matsui Y, Zsebo K, Hogan BL. Derivation of pluripotential embryonic stem cells from murine primordial germ cells in culture. *Cell*. 1992;70(5):841-7.
  46. Pierce GB, Jr., Verney EL. An in vitro and in vivo study of differentiation in teratocarcinomas. *Cancer*. 1961;14:1017-29.
  47. Martin GR, Evans MJ. Differentiation of clonal lines of teratocarcinoma cells: formation of embryoid bodies in vitro. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1975;72(4):1441-5.
  48. Takahashi K, Yamanaka S. Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. *Cell*. 2006;126(4):663-76.
  49. Takahashi K, Tanabe K, Ohnuki M, Narita M, Ichisaka T, Tomoda K, et al. Induction of pluripotent stem cells from adult human fibroblasts by defined factors. *Cell*. 2007;131(5):861-72.
  50. Waddington CH. *The strategy of the genes*. Allen & Unwin, London. 1956:1.
  51. Weismann A. *The Germ-Plasm: A Theory of Heredity*. New York, NY: Scribner's. 1893.
  52. Gurdon JB. The developmental capacity of nuclei taken from intestinal epithelium cells of feeding tadpoles. *Journal of embryology and experimental morphology*. 1962;10:622-40.
  53. Davis RL, Weintraub H, Lassar AB. Expression of a single transfected cDNA converts fibroblasts to myoblasts. *Cell*. 1987;51(6):987-1000.
  54. Yu J, Vodyanik MA, Smuga-Otto K, Antosiewicz-Bourget J, Frane JL, Tian S, et al. Induced pluripotent stem cell lines derived from human somatic cells. *Science*. 2007;318(5858):1917-20.
  55. Harding J, Mirochnitchenko O. Preclinical studies for induced pluripotent stem cell-based therapeutics. *The Journal of biological chemistry*. 2014;289(8):4585-93.
-

- 
56. Whitworth DJ, Banks TA. Stem cell therapies for treating osteoarthritis: prescient or premature? *Veterinary journal*. 2014;202(3):416-24.
57. European Bank for induced pluripotent Stem Cells (EBiSC) [4.02.2019]. Available from: <http://www.ebisc.org>.
58. Human Pluripotent Stem Cell Registry [4.02.2019]. Available from: <https://hpscereg.eu>.
59. Driessen BJH, Logie C, Vonk LA. Cellular reprogramming for clinical cartilage repair. *Cell biology and toxicology*. 2017;33(4):329-49.
60. Higgins CA, Itoh M, Inoue K, Richardson GD, Jahoda CA, Christiano AM. Reprogramming of human hair follicle dermal papilla cells into induced pluripotent stem cells. *The Journal of investigative dermatology*. 2012;132(6):1725-7.
61. Maherali N, Ahfeldt T, Rigamonti A, Utikal J, Cowan C, Hochedlinger K. A high-efficiency system for the generation and study of human induced pluripotent stem cells. *Cell stem cell*. 2008;3(3):340-5.
62. Schlaeger TM, Daheron L, Brickler TR, Entwisle S, Chan K, Cianci A, et al. A comparison of non-integrating reprogramming methods. 2015;33(1):58-63.
63. Utikal J, Polo JM, Stadtfeld M, Maherali N, Kulalert W, Walsh RM, et al. Immortalization eliminates a roadblock during cellular reprogramming into iPS cells. *Nature*. 2009;460(7259):1145-8.
64. Streckfuss-Bomeke K, Wolf F, Azizian A, Stauske M, Tiburcy M, Wagner S, et al. Comparative study of human-induced pluripotent stem cells derived from bone marrow cells, hair keratinocytes, and skin fibroblasts. *European heart journal*. 2013;34(33):2618-29.
65. Hong SG, Dunbar CE, Winkler T. Assessing the risks of genotoxicity in the therapeutic development of induced pluripotent stem cells. *Molecular therapy : the journal of the American Society of Gene Therapy*. 2013;21(2):272-81.
66. Sun N, Panetta NJ, Gupta DM, Wilson KD, Lee A, Jia F, et al. Feeder-free derivation of induced pluripotent stem cells from adult human adipose stem cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2009;106(37):15720-5.
67. Ylidrim S. *Induced Pluripotent Stem Cells*. 1 ed: Springer-Verlag New York; 2012. VIII, 73 p.
68. Cherry AB, Daley GQ. Reprogrammed cells for disease modeling and regenerative medicine. *Annual review of medicine*. 2013;64:277-90.
69. Rao MS, Malik N. Assessing iPSC reprogramming methods for their suitability in translational medicine. *Journal of cellular biochemistry*. 2012;113(10):3061-8.
70. Okita K, Nakagawa M, Hyenjong H, Ichisaka T, Yamanaka S. Generation of mouse induced pluripotent stem cells without viral vectors. *Science*. 2008;322(5903):949-53.
71. Nakagawa M, Koyanagi M, Tanabe K, Takahashi K, Ichisaka T, Aoi T, et al. Generation of induced pluripotent stem cells without Myc from mouse and human fibroblasts. *Nature biotechnology*. 2008;26(1):101-6.
72. Rony IK, Baten A, Bloomfield JA, Islam ME, Billah MM, Islam KD. Inducing pluripotency in vitro: recent advances and highlights in induced pluripotent stem cells generation and pluripotency reprogramming. *Cell Prolif*. 2015;48(2):140-56.
73. Wernig M, Lengner CJ, Hanna J, Lodato MA, Steine E, Foreman R, et al. A drug-inducible
-

---

transgenic system for direct reprogramming of multiple somatic cell types. *Nature biotechnology*. 2008;26(8):916-24.

74. Medvedev SP, Grigor'eva EV, Shevchenko AI, Malakhova AA, Dementyeva EV, Shilov AA, et al. Human induced pluripotent stem cells derived from fetal neural stem cells successfully undergo directed differentiation into cartilage. *Stem cells and development*. 2011;20(6):1099-112.

75. Huangfu D, Osafune K, Maehr R, Guo W, Eijkelenboom A, Chen S, et al. Induction of pluripotent stem cells from primary human fibroblasts with only Oct4 and Sox2. *Nature biotechnology*. 2008;26(11):1269-75.

76. Li W, Wei W, Zhu S, Zhu J, Shi Y, Lin T, et al. Generation of rat and human induced pluripotent stem cells by combining genetic reprogramming and chemical inhibitors. *Cell stem cell*. 2009;4(1):16-9.

77. Simonsson SVu, R.C.; Hartl, L.; Redwan, I.N.; Bhadury, J. Induced Pluripotent Stem Cells and Yamanaka factors. In: Elsevier AP, editor. *Encyclopedia of Cancer*. 3 ed: Boffetta, P.; Hainaut, P. (Eds.); 2019. p. 11.

78. Walia B, Satija N, Tripathi RP, Gangenahalli GU. Induced pluripotent stem cells: fundamentals and applications of the reprogramming process and its ramifications on regenerative medicine. *Stem cell reviews*. 2012;8(1):100-15.

79. Heng JC, Feng B, Han J, Jiang J, Kraus P, Ng JH, et al. The nuclear receptor Nr5a2 can replace Oct4 in the reprogramming of murine somatic cells to pluripotent cells. *Cell stem cell*. 2010;6(2):167-74.

80. Long Y, Wang M, Gu H, Xie X. Bromodeoxyuridine promotes full-chemical induction of mouse pluripotent stem cells. *Cell research*. 2015;25(10):1171-4.

81. Schlaeger TM, Daheron L, Brickler TR, Entwisle S, Chan K, Cianci A, et al. A comparison of non-integrating reprogramming methods. *Nature biotechnology*. 2015;33(1):58-63.

82. Jia F, Wilson KD, Sun N, Gupta DM, Huang M, Li Z, et al. A nonviral minicircle vector for deriving human iPS cells. *Nature methods*. 2010;7(3):197-9.

83. Kang X, Yu Q, Huang Y, Song B, Chen Y, Gao X, et al. Effects of Integrating and Non-Integrating Reprogramming Methods on Copy Number Variation and Genomic Stability of Human Induced Pluripotent Stem Cells. *PloS one*. 2015;10(7):e0131128.

84. Sommer CA, Stadtfeld M, Murphy GJ, Hochedlinger K, Kotton DN, Mostoslavsky G. Induced pluripotent stem cell generation using a single lentiviral stem cell cassette. *Stem cells*. 2009;27(3):543-9.

85. Malik N, Rao MS. A review of the methods for human iPSC derivation. *Methods in molecular biology*. 2013;997:23-33.

86. Fusaki N, Ban H, Nishiyama A, Saeki K, Hasegawa M. Efficient induction of transgene-free human pluripotent stem cells using a vector based on Sendai virus, an RNA virus that does not integrate into the host genome. *Proceedings of the Japan Academy Series B, Physical and biological sciences*. 2009;85(8):348-62.

87. Seki T, Yuasa S, Oda M, Egashira T, Yae K, Kusumoto D, et al. Generation of induced pluripotent stem cells from human terminally differentiated circulating T cells. *Cell stem cell*. 2010;7(1):11-4.

88. Inoue M, Tokusumi Y, Ban H, Kanaya T, Tokusumi T, Nagai Y, et al. Nontransmissible virus-like particle formation by F-deficient sendai virus is temperature sensitive and reduced by mutations in M

---

- 
- and HN proteins. *Journal of virology*. 2003;77(5):3238-46.
89. Skottman H, Hovatta O. Culture conditions for human embryonic stem cells. *Reproduction*. 2006;132(5):691-8.
  90. Wagner K, Welch D. Feeder-free adaptation, culture and passaging of human IPS cells using complete Knockout Serum Replacement feeder-free medium. *Journal of visualized experiments : JoVE*. 2010(41).
  91. Beers J, Gulbranson DR, George N, Siniscalchi LI, Jones J, Thomson JA, et al. Passaging and colony expansion of human pluripotent stem cells by enzyme-free dissociation in chemically defined culture conditions. *Nature protocols*. 2012;7(11):2029-40.
  92. International Stem Cell I, Adewumi O, Aflatoonian B, Ahrlund-Richter L, Amit M, Andrews PW, et al. Characterization of human embryonic stem cell lines by the International Stem Cell Initiative. *Nature biotechnology*. 2007;25(7):803-16.
  93. Crook JM, Hei D, Stacey G. The International Stem Cell Banking Initiative (ISCBI): raising standards to bank on. *In vitro cellular & developmental biology Animal*. 2010;46(3-4):169-72.
  94. Marti M, Mulero L, Pardo C, Morera C, Carrio M, Laricchia-Robbio L, et al. Characterization of pluripotent stem cells. *Nature protocols*. 2013;8(2):223-53.
  95. Sharma U, Pal D, Prasad R. Alkaline phosphatase: an overview. *Indian journal of clinical biochemistry : IJCB*. 2014;29(3):269-78.
  96. Zhao J, Jiang WJ, Sun C, Hou CZ, Yang XM, Gao JG. Induced pluripotent stem cells: origins, applications, and future perspectives. *Journal of Zhejiang University Science B*. 2013;14(12):1059-69.
  97. Hirschi KK, Li S, Roy K. Induced pluripotent stem cells for regenerative medicine. *Annual review of biomedical engineering*. 2014;16:277-94.
  98. Kumazaki TT, T; Matsuo, T; Kamada, M; Mitsui, Y. Re - emergence of undifferentiated cells from transplants of human induced pluripotent stem cells as a possible risk factor of tumourigenesis. *Cell Biology International Reports*. 2013;21(1):7.
  99. Willard VP, Diekman BO, Sanchez-Adams J, Christoforou N, Leong KW, Guilak F. Use of cartilage derived from murine induced pluripotent stem cells for osteoarthritis drug screening. *Arthritis & rheumatology (Hoboken, NJ)*. 2014;66(11):3062-72.
  100. Augustyniak E, Trzeciak T, Richter M, Kaczmarczyk J, Suchorska W. The role of growth factors in stem cell-directed chondrogenesis: a real hope for damaged cartilage regeneration. *International orthopaedics*. 2015;39(5):995-1003.
  101. Castro-Vinuelas R, Sanjurjo-Rodriguez C, Pineiro-Ramil M, Hermida-Gomez T, Fuentes-Boquete IM, de Toro-Santos FJ, et al. Induced pluripotent stem cells for cartilage repair: current status and future perspectives. *European cells & materials*. 2018;36:96-109.
  102. Tsumaki N, Okada M, Yamashita A. iPS cell technologies and cartilage regeneration. *Bone*. 2015;70:48-54.
  103. Wei Y, Zeng W, Wan R, Wang J, Zhou Q, Qiu S, et al. Chondrogenic differentiation of induced pluripotent stem cells from osteoarthritic chondrocytes in alginate matrix. *European cells & materials*. 2012;23:1-12.
  104. Lietman SA. Induced pluripotent stem cells in cartilage repair. *World journal of orthopedics*.
-

---

2016;7(3):149-55.

105. Suchorska WM, Augustyniak E, Richter M, Trzeciak T. Comparison of Four Protocols to Generate Chondrocyte-Like Cells from Human Induced Pluripotent Stem Cells (hiPSCs). *Stem cell reviews*. 2017;13(2):299-308.

106. Cheng A, Kapacee Z, Peng J, Lu S, Lucas RJ, Hardingham TE, et al. Cartilage repair using human embryonic stem cell-derived chondroprogenitors. *Stem cells translational medicine*. 2014;3(11):1287-94.

107. Dominici M, Le Blanc K, Mueller I, Slaper-Cortenbach I, Marini F, Krause D, et al. Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy*. 2006;8(4):315-7.

108. Sanjurjo-Rodriguez C, Martinez-Sanchez AH, Hermida-Gomez T, Fuentes-Boquete I, Diaz-Prado S, Blanco FJ. Differentiation of human mesenchymal stromal cells cultured on collagen sponges for cartilage repair. *Histology and histopathology*. 2016;31(11):1221-39.

109. Liu Y, Goldberg AJ, Dennis JE, Gronowicz GA, Kuhn LT. One-step derivation of mesenchymal stem cell (MSC)-like cells from human pluripotent stem cells on a fibrillar collagen coating. *PloS one*. 2012;7(3):e33225.

110. Nejadnik H, Diecke S, Lenkov OD, Chapelin F, Donig J, Tong X, et al. Improved approach for chondrogenic differentiation of human induced pluripotent stem cells. *Stem cell reviews*. 2015;11(2):242-53.

111. Koyama N, Miura M, Nakao K, Kondo E, Fujii T, Taura D, et al. Human induced pluripotent stem cells differentiated into chondrogenic lineage via generation of mesenchymal progenitor cells. *Stem cells and development*. 2013;22(1):102-13.

112. Villa-Diaz LG, Brown SE, Liu Y, Ross AM, Lahann J, Parent JM, et al. Derivation of mesenchymal stem cells from human induced pluripotent stem cells cultured on synthetic substrates. *Stem cells*. 2012;30(6):1174-81.

113. Lian Q, Chow Y, Esteban MA, Pei D, Tse HF. Future perspective of induced pluripotent stem cells for diagnosis, drug screening and treatment of human diseases. *Thrombosis and haemostasis*. 2010;104(1):39-44.

114. Stadtfeld M, Hochedlinger K. Induced pluripotency: history, mechanisms, and applications. *Genes & development*. 2010;24(20):2239-63.

115. Lee J, Taylor SE, Smeriglio P, Lai J, Maloney WJ, Yang F, et al. Early induction of a prechondrogenic population allows efficient generation of stable chondrocytes from human induced pluripotent stem cells. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*. 2015;29(8):3399-410.

116. Liu H, Yang L, Yu FF, Wang S, Wu C, Qu C, et al. The potential of induced pluripotent stem cells as a tool to study skeletal dysplasias and cartilage-related pathologic conditions. *Osteoarthritis and cartilage*. 2017;25(5):616-24.

117. Kim MJ, Son MJ, Son MY, Seol B, Kim J, Park J, et al. Generation of human induced pluripotent stem cells from osteoarthritis patient-derived synovial cells. *Arthritis and rheumatism*. 2011;63(10):3010-21.

---

- 
118. Xu M, Stattin EL, Shaw G, Heinegard D, Sullivan G, Wilmut I, et al. Chondrocytes Derived From Mesenchymal Stromal Cells and Induced Pluripotent Cells of Patients With Familial Osteochondritis Dissecans Exhibit an Endoplasmic Reticulum Stress Response and Defective Matrix Assembly. *Stem cells translational medicine*. 2016;5(9):1171-81.
119. Okano H, Yamanaka S. iPS cell technologies: significance and applications to CNS regeneration and disease. *Molecular brain*. 2014;7:22.
120. Yang SL, Harnish E, Leeuw T, Dietz U, Batchelder E, Wright PS, et al. Compound screening platform using human induced pluripotent stem cells to identify small molecules that promote chondrogenesis. *Protein & cell*. 2012;3(12):934-42.
121. Yamashita A, Morioka M, Yahara Y, Okada M, Kobayashi T, Kuriyama S, et al. Generation of scaffoldless hyaline cartilaginous tissue from human iPSCs. *Stem cell reports*. 2015;4(3):404-18.
122. Novak D, Weina K, Utikal J. From skin to other cell types of the body. *Journal der Deutschen Dermatologischen Gesellschaft = Journal of the German Society of Dermatology : JDDG*. 2014;12(9):789-92.
123. Diekman BO, Christoforou N, Willard VP, Sun H, Sanchez-Adams J, Leong KW, et al. Cartilage tissue engineering using differentiated and purified induced pluripotent stem cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2012;109(47):19172-7.
124. Oldershaw RA, Baxter MA, Lowe ET, Bates N, Grady LM, Soncin F, et al. Directed differentiation of human embryonic stem cells toward chondrocytes. *Nature biotechnology*. 2010;28(11):1187-94.
125. Zhang W, Ouyang H, Dass CR, Xu J. Current research on pharmacologic and regenerative therapies for osteoarthritis. *Bone research*. 2016;4:15040.
126. Fuentes-Boquete IA-G, M.A.; Díaz-Prado, S; Hermida-Gómez, T; de Toro-Santos, F.J; Blanco-García, F.J. Tratamiento de lesiones del cartilago articular con terapia celular. *Reumatología clínica*. 2007;3(SE3):7.
127. Uto S, Nishizawa S, Takasawa Y, Asawa Y, Fujihara Y, Takato T, et al. Bone and cartilage repair by transplantation of induced pluripotent stem cells in murine joint defect model. *Biomedical research*. 2013;34(6):281-8.
128. Ko JY, Kim KI, Park S, Im GI. In vitro chondrogenesis and in vivo repair of osteochondral defect with human induced pluripotent stem cells. *Biomaterials*. 2014;35(11):3571-81.
129. Liu J, Nie H, Xu Z, Niu X, Guo S, Yin J, et al. The effect of 3D nanofibrous scaffolds on the chondrogenesis of induced pluripotent stem cells and their application in restoration of cartilage defects. *PloS one*. 2014;9(11):e111566.
130. Saito T, Yano F, Mori D, Kawata M, Hoshi K, Takato T, et al. Hyaline cartilage formation and tumorigenesis of implanted tissues derived from human induced pluripotent stem cells. *Biomedical research*. 2015;36(3):179-86.
131. Nguyen D, Hagg DA, Forsman A, Ekholm J, Nimkingratana P, Brantsing C, et al. Cartilage Tissue Engineering by the 3D Bioprinting of iPS Cells in a Nanocellulose/Alginate Bioink. *Scientific reports*. 2017;7(1):658.
132. Dodziuk H. Applications of 3D printing in healthcare. *Kardiochirurgia i torakochirurgia polska =*
-

Polish journal of cardio-thoracic surgery. 2016;13(3):283-93.

133. Apelgren P, Amoroso M, Lindahl A, Brantsing C, Rotter N, Gatenholm P, et al. Chondrocytes and stem cells in 3D-bioprinted structures create human cartilage in vivo. *PloS one*. 2017;12(12):e0189428.

134. Markstedt K, Mantas A, Tournier I, Martinez Avila H, Hagg D, Gatenholm P. 3D Bioprinting Human Chondrocytes with Nanocellulose-Alginate Bioink for Cartilage Tissue Engineering Applications. *Biomacromolecules*. 2015;16(5):1489-96.

135. Moller T, Amoroso M, Hagg D, Brantsing C, Rotter N, Apelgren P, et al. In Vivo Chondrogenesis in 3D Bioprinted Human Cell-laden Hydrogel Constructs. *Plastic and reconstructive surgery Global open*. 2017;5(2):e1227.

136. Reid JA, Mollica PA, Johnson GD, Ogle RC, Bruno RD, Sachs PC. Accessible bioprinting: adaptation of a low-cost 3D-printer for precise cell placement and stem cell differentiation. *Biofabrication*. 2016;8(2):025017.

137. Hersel U, Dahmen C, Kessler H. RGD modified polymers: biomaterials for stimulated cell adhesion and beyond. *Biomaterials*. 2003;24(24):4385-415.

138. Nishiuchi R, Takagi J, Hayashi M, Ido H, Yagi Y, Sanzen N, et al. Ligand-binding specificities of laminin-binding integrins: a comprehensive survey of laminin-integrin interactions using recombinant alpha3beta1, alpha6beta1, alpha7beta1 and alpha6beta4 integrins. *Matrix biology : journal of the International Society for Matrix Biology*. 2006;25(3):189-97.

139. Aasen T, Raya A, Barrero MJ, Garreta E, Consiglio A, Gonzalez F, et al. Efficient and rapid generation of induced pluripotent stem cells from human keratinocytes. *Nature biotechnology*. 2008;26(11):1276-84.

140. Vandesompele J, De Preter K, Pattyn F, Poppe B, Van Roy N, De Paepe A, et al. Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. *Genome biology*. 2002;3(7):RESEARCH0034.

141. Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2<sup>-</sup>( $\Delta\Delta C_T$ ) Method. *Methods (San Diego, Calif)*. 2001;25(4):402-8.

142. Borestrom C, Simonsson S, Enochson L, Bigdeli N, Brantsing C, Ellerstrom C, et al. Footprint-free human induced pluripotent stem cells from articular cartilage with redifferentiation capacity: a first step toward a clinical-grade cell source. *Stem cells translational medicine*. 2014;3(4):433-47.

143. Arellano CM, Vilches A, Clemente E, Pascual-Pascual SI, Bolinches-Amoros A, Castro AA, et al. Generation of a human iPSC line from a patient with autosomal recessive spastic ataxia of Charlevoix-Saguenay (ARSACS) caused by mutation in SACSIN gene. *Stem Cell Res*. 2018;31:249-52.

144. Swaroop M, Brooks MJ, Gieser L, Swaroop A, Zheng W. Patient iPSC-derived neural stem cells exhibit phenotypes in concordance with the clinical severity of mucopolysaccharidosis I. *Human molecular genetics*. 2018;27(20):3612-26.

145. Vangipuram M, Ting D, Kim S, Diaz R, Schule B. Skin punch biopsy explant culture for derivation of primary human fibroblasts. *Journal of visualized experiments : JoVE*. 2013(77):e3779.

146. Chen IP, Fukuda K, Fusaki N, Iida A, Hasegawa M, Lichtler A, et al. Induced pluripotent stem cell reprogramming by integration-free Sendai virus vectors from peripheral blood of patients with

- 
- craniometaphyseal dysplasia. *Cellular reprogramming*. 2013;15(6):503-13.
147. Kahler DJ, Ahmad FS, Ritz A, Hua H, Moroziewicz DN, Sproul AA, et al. Improved methods for reprogramming human dermal fibroblasts using fluorescence activated cell sorting. *PloS one*. 2013;8(3):e59867.
148. Sridharan R, Plath K. Illuminating the black box of reprogramming. *Cell stem cell*. 2008;2(4):295-7.
149. Watanabe K, Ueno M, Kamiya D, Nishiyama A, Matsumura M, Wataya T, et al. A ROCK inhibitor permits survival of dissociated human embryonic stem cells. *Nature biotechnology*. 2007;25(6):681-6.
150. Seki T, Fukuda K. Methods of induced pluripotent stem cells for clinical application. *World journal of stem cells*. 2015;7(1):116-25.
151. Totonchi M, Taei A, Seifinejad A, Tabebordbar M, Rassouli H, Farrokhi A, et al. Feeder- and serum-free establishment and expansion of human induced pluripotent stem cells. *The International journal of developmental biology*. 2010;54(5):877-86.
152. Kishino Y, Seki T, Fujita J, Yuasa S, Tohyama S, Kunitomi A, et al. Derivation of transgene-free human induced pluripotent stem cells from human peripheral T cells in defined culture conditions. *PloS one*. 2014;9(5):e97397.
153. Hey CAB, Saltokova KB, Bisgaard HC, Moller LB. Comparison of two different culture conditions for derivation of early hiPSC. *Cell biology international*. 2018;42(11):1467-73.
154. Gargotti M, Lopez-Gonzalez U, Byrne HJ, Casey A. Comparative studies of cellular viability levels on 2D and 3D in vitro culture matrices. *Cytotechnology*. 2018;70(1):261-73.
155. Chen G, Gulbranson DR, Hou Z, Bolin JM, Ruotti V, Probasco MD, et al. Chemically defined conditions for human iPSC derivation and culture. *Nature methods*. 2011;8(5):424-9.
156. Chen YH, Pruett-Miller SM. Improving single-cell cloning workflow for gene editing in human pluripotent stem cells. *Stem Cell Res*. 2018;31:186-92.
157. Ghosheh N, Olsson B, Edsbacke J, Kuppers-Munther B, Van Giezen M, Asplund A, et al. Highly Synchronized Expression of Lineage-Specific Genes during In Vitro Hepatic Differentiation of Human Pluripotent Stem Cell Lines. *Stem cells international*. 2016;2016:8648356.
158. Liang G, Zhang Y. Genetic and epigenetic variations in iPSCs: potential causes and implications for application. *Cell stem cell*. 2013;13(2):149-59.
159. Albalushi H, Kurek M, Karlsson L, Landreh L, Kjartansdottir KR, Soder O, et al. Laminin 521 Stabilizes the Pluripotency Expression Pattern of Human Embryonic Stem Cells Initially Derived on Feeder Cells. *Stem cells international*. 2018;2018:7127042.
160. Lam AT, Li J, Chen AK, Birch WR, Reuveny S, Oh SK. Improved Human Pluripotent Stem Cell Attachment and Spreading on Xeno-Free Laminin-521-Coated Microcarriers Results in Efficient Growth in Agitated Cultures. *BioResearch open access*. 2015;4(1):242-57.
161. Lu HF, Chai C, Lim TC, Leong MF, Lim JK, Gao S, et al. A defined xeno-free and feeder-free culture system for the derivation, expansion and direct differentiation of transgene-free patient-specific induced pluripotent stem cells. *Biomaterials*. 2014;35(9):2816-26.
162. Rodin S, Antonsson L, Niaudet C, Simonson OE, Salmela E, Hansson EM, et al. Clonal
-



culturing of human embryonic stem cells on laminin-521/E-cadherin matrix in defined and xeno-free environment. *Nature communications*. 2014;5:3195.

163. Hongisto H, Ilmarinen T, Vattulainen M, Mikhailova A, Skottman H. Xeno- and feeder-free differentiation of human pluripotent stem cells to two distinct ocular epithelial cell types using simple modifications of one method. *Stem cell research & therapy*. 2017;8(1):291.

164. Bianco C, Rangel MC, Castro NP, Nagaoka T, Rollman K, Gonzales M, et al. Role of Cripto-1 in stem cell maintenance and malignant progression. *The American journal of pathology*. 2010;177(2):532-40.

165. ten Berge D, Koole W, Fuerer C, Fish M, Eroglu E, Nusse R. Wnt signaling mediates self-organization and axis formation in embryoid bodies. *Cell stem cell*. 2008;3(5):508-18.

166. Shevde NK, Mael AA. Techniques in embryoid body formation from human pluripotent stem cells. *Methods in molecular biology*. 2013;946:535-46.

167. Liyang G, Abdullah S, Rosli R, Nordin N. Neural Commitment of Embryonic Stem Cells through the Formation of Embryoid Bodies (EBs). *The Malaysian journal of medical sciences : MJMS*. 2014;21(5):8-16.

168. Strassler ET, Aalto-Setälä K, Kiamehr M, Landmesser U, Krankel N. Age Is Relative-Impact of Donor Age on Induced Pluripotent Stem Cell-Derived Cell Functionality. *Frontiers in cardiovascular medicine*. 2018;5:4.

169. Nishizawa M, Chonabayashi K, Nomura M, Tanaka A, Nakamura M, Inagaki A, et al. Epigenetic Variation between Human Induced Pluripotent Stem Cell Lines Is an Indicator of Differentiation Capacity. *Cell stem cell*. 2016;19(3):341-54.

170. Saitta B, Passarini J, Sareen D, Ornelas L, Sahabian A, Argade S, et al. Patient-derived skeletal dysplasia induced pluripotent stem cells display abnormal chondrogenic marker expression and regulation by BMP2 and TGFβ1. *Stem cells and development*. 2014;23(13):1464-78.

171. Lee J, Kim Y, Yi H, Diecke S, Kim J, Jung H, et al. Generation of disease-specific induced pluripotent stem cells from patients with rheumatoid arthritis and osteoarthritis. *Arthritis research & therapy*. 2014;16(1):R41.

172. Näkki A. Search for susceptibility genes in osteoarthritis: University of Helsinki; 2012.

173. Näkki A, Rodriguez-Fontenla C, Gonzalez A, Harilainen A, Leino-Arjas P, Heliovaara M, et al. Association study of MMP8 gene in osteoarthritis. *Connective tissue research*. 2016;57(1):44-52.

174. Zhai G, van Meurs JB, Livshits G, Meulenbelt I, Valdes AM, Soranzo N, et al. A genome-wide association study suggests that a locus within the ataxin 2 binding protein 1 gene is associated with hand osteoarthritis: the Treat-OA consortium. *Journal of medical genetics*. 2009;46(9):614-6.

175. Dodd AW, Syddall CM, Loughlin J. A rare variant in the osteoarthritis-associated locus GDF5 is functional and reveals a site that can be manipulated to modulate GDF5 expression. *European journal of human genetics : EJHG*. 2013;21(5):517-21.

176. Evangelou E, Chapman K, Meulenbelt I, Karassa FB, Loughlin J, Carr A, et al. Large-scale analysis of association between GDF5 and FRZB variants and osteoarthritis of the hip, knee, and hand. *Arthritis and rheumatism*. 2009;60(6):1710-21.

177. Murphy MK, Huey DJ, Hu JC, Athanasiou KA. TGF-β1, GDF-5, and BMP-2 stimulation

induces chondrogenesis in expanded human articular chondrocytes and marrow-derived stromal cells. *Stem cells*. 2015;33(3):762-73.

178. Huang X, Zhang W, Shao Z. Association between GDF5 rs143383 genetic polymorphism and musculoskeletal degenerative diseases susceptibility: a meta-analysis. *BMC medical genetics*. 2018;19(1):169.

179. Yang HY, Hu WH, Jiang T, Zhao H. SMAD3 gene rs12901499 polymorphism increased the risk of osteoarthritis. *Bioscience reports*. 2018;38(3).

180. Valdes AM, Spector TD, Tamm A, Kisand K, Doherty SA, Dennison EM, et al. Genetic variation in the SMAD3 gene is associated with hip and knee osteoarthritis. *Arthritis and rheumatism*. 2010;62(8):2347-52.

181. Aref-Eshghi E, Zhang Y, Hart D, Valdes AM, Furey A, Martin G, et al. SMAD3 is associated with the total burden of radiographic osteoarthritis: the Chingford study. *PloS one*. 2014;9(5):e97786.

182. Su SL, Yang HY, Lee HS, Huang GS, Lee CH, Liu WS, et al. Gene-gene interactions between TGF-beta/Smad3 signalling pathway polymorphisms affect susceptibility to knee osteoarthritis. *BMJ open*. 2015;5(6):e007931.

183. Zhong F, Lu J, Wang Y, Song H. Genetic variation of SMAD3 is associated with hip osteoarthritis in a Chinese Han population. *The Journal of international medical research*. 2018;46(3):1178-86.

184. Li TF, Darowish M, Zuscik MJ, Chen D, Schwarz EM, Rosier RN, et al. Smad3-deficient chondrocytes have enhanced BMP signaling and accelerated differentiation. *Journal of bone and mineral research : the official journal of the American Society for Bone and Mineral Research*. 2006;21(1):4-16.

185. van de Laar IM, Oldenburg RA, Pals G, Roos-Hesselink JW, de Graaf BM, Verhagen JM, et al. Mutations in SMAD3 cause a syndromic form of aortic aneurysms and dissections with early-onset osteoarthritis. *Nature genetics*. 2011;43(2):121-6.

186. Stefansson SE, Jonsson H, Ingvarsson T, Manolescu I, Jonsson HH, Olafsdottir G, et al. Genomewide scan for hand osteoarthritis: a novel mutation in matrilin-3. *American journal of human genetics*. 2003;72(6):1448-59.

187. Min JL, Meulenbelt I, Riyazi N, Kloppenburg M, Houwing-Duistermaat JJ, Seymour AB, et al. Association of matrilin-3 polymorphisms with spinal disc degeneration and osteoarthritis of the first carpometacarpal joint of the hand. *Annals of the rheumatic diseases*. 2006;65(8):1060-6.

188. Sydorchuk LS, Y; Fediv, O; Havrysh, L; Teleki, Y; Sydorchuk, A; Anna I. Kshanovska, A; Turubarova-Leunova, N; Lekhai, D. The polymorphism of matrilin-3 (rs77245812) and interleukin-10 (rs1800872) genes in osteoarthritis patients with arterial hypertension, obesity and type 2 diabetes mellitus *Archives of the Balkan Medical Union*. 2017;52(4):7.

189. Rose BJ, Kooyman DL. A Tale of Two Joints: The Role of Matrix Metalloproteases in Cartilage Biology. *Disease markers*. 2016;2016:4895050.

190. Davidson RK, Waters JG, Kevorkian L, Darrah C, Cooper A, Donell ST, et al. Expression profiling of metalloproteinases and their inhibitors in synovium and cartilage. *Arthritis research & therapy*. 2006;8(4):R124.

191. Stykarsdottir U, Thorleifsson G, Helgadóttir HT, Bomer N, Metrustry S, Bierma-Zeinstra S, et

- al. Severe osteoarthritis of the hand associates with common variants within the ALDH1A2 gene and with rare variants at 1p31. *Nature genetics*. 2014;46(5):498-502.
192. Vasilou V, Thompson DC, Smith C, Fujita M, Chen Y. Aldehyde dehydrogenases: from eye crystallins to metabolic disease and cancer stem cells. *Chemico-biological interactions*. 2013;202(1-3):2-10.
193. Unguryte A, Bernotiene E, Bagdonas E, Garberyte S, Porvaneckas N, Jorgensen C. Human articular chondrocytes with higher aldehyde dehydrogenase activity have stronger expression of COL2A1 and SOX9. *Osteoarthritis and cartilage*. 2016;24(5):873-82.
194. Chu M, Zhu X, Wang C, Rong J, Wang Y, Wang S, et al. The rs4238326 polymorphism in ALDH1A2 gene potentially associated with non-post traumatic knee osteoarthritis susceptibility: a two-stage population-based study. *Osteoarthritis and cartilage*. 2017;25(7):1062-7.
195. Zhu LC, A; Groves, K; Furniss, D; Watt, F.E; Gardiner, M; Vincent, T.L. Polymorphic variants in ALDH1A2 determine the expression level of ALDH1A2 and CYP19A1 in the cartilage of patients undergoing trapeziectomy for severe thumb osteoarthritis. *Osteoarthritis and cartilage*. 2018;26.
196. Hamalainen S, Solovieva S, Vehmas T, Leino-Arjas P, Hirvonen A. Variations in the TNFalpha gene and their interactions with the IL4R and IL10 genes in relation to hand osteoarthritis. *BMC musculoskeletal disorders*. 2014;15:311.
197. Kou S, Wu Y. Meta-analysis of tumor necrosis factor alpha -308 polymorphism and knee osteoarthritis risk. *BMC musculoskeletal disorders*. 2014;15:373.
198. Vargiolu M, Silvestri T, Bonora E, Dolzani P, Pulsatelli L, Addimanda O, et al. Interleukin-4/interleukin-4 receptor gene polymorphisms in hand osteoarthritis. *Osteoarthritis and cartilage*. 2010;18(6):810-6.
199. Kerkhof HJ, Doherty M, Arden NK, Abramson SB, Attur M, Bos SD, et al. Large-scale meta-analysis of interleukin-1 beta and interleukin-1 receptor antagonist polymorphisms on risk of radiographic hip and knee osteoarthritis and severity of knee osteoarthritis. *Osteoarthritis and cartilage*. 2011;19(3):265-71.
200. Shibata H, Huynh DP, Pulst SM. A novel protein with RNA-binding motifs interacts with ataxin-2. *Human molecular genetics*. 2000;9(9):1303-13.
201. Martin CL, Duvall JA, Ilkin Y, Simon JS, Arreaza MG, Wilkes K, et al. Cytogenetic and molecular characterization of A2BP1/FOX1 as a candidate gene for autism. *American journal of medical genetics Part B, Neuropsychiatric genetics : the official publication of the International Society of Psychiatric Genetics*. 2007;144b(7):869-76.
202. Fridley BL, Biernacka JM. Gene set analysis of SNP data: benefits, challenges, and future directions. *European journal of human genetics : EJHG*. 2011;19(8):837-43.
203. TheinHan W, Liu J, Tang M, Chen W, Cheng L, Xu HH. Induced pluripotent stem cell-derived mesenchymal stem cell seeding on biofunctionalized calcium phosphate cements. *Bone research*. 2013;4:371-84.
204. Frobel J, Hemeda H, Lenz M, Abagnale G, Joussen S, Denecke B, et al. Epigenetic rejuvenation of mesenchymal stromal cells derived from induced pluripotent stem cells. *Stem cell reports*. 2014;3(3):414-22.

- 
205. Kang R, Zhou Y, Tan S, Zhou G, Aagaard L, Xie L, et al. Mesenchymal stem cells derived from human induced pluripotent stem cells retain adequate osteogenicity and chondrogenicity but less adipogenicity. *Stem cell research & therapy*. 2015;6:144.
206. Tan Q, Lui PP, Rui YF. Effect of in vitro passaging on the stem cell-related properties of tendon-derived stem cells-implications in tissue engineering. *Stem cells and development*. 2012;21(5):790-800.
207. Uder C, Bruckner S, Winkler S, Tautenhahn HM, Christ B. Mammalian MSC from selected species: Features and applications. *Cytometry Part A : the journal of the International Society for Analytical Cytology*. 2018;93(1):32-49.
208. Sanjurjo-Rodríguez C. Ingeniería tisular del hueso y el cartilago empleando células mesenquimales y biomateriales: Universidad de A Coruña; 2016.
209. Boyd NL, Robbins KR, Dhara SK, West FD, Stice SL. Human embryonic stem cell-derived mesoderm-like epithelium transitions to mesenchymal progenitor cells. *Tissue engineering Part A*. 2009;15(8):1897-907.
210. Chung MT, Liu C, Hyun JS, Lo DD, Montoro DT, Hasegawa M, et al. CD90 (Thy-1)-positive selection enhances osteogenic capacity of human adipose-derived stromal cells. *Tissue engineering Part A*. 2013;19(7-8):989-97.
211. Chan CK, Chen CC, Luppen CA, Kim JB, DeBoer AT, Wei K, et al. Endochondral ossification is required for haematopoietic stem-cell niche formation. *Nature*. 2009;457(7228):490-4.
212. Nakamura H, Yukita A, Ninomiya T, Hosoya A, Hiraga T, Ozawa H. Localization of Thy-1-positive cells in the perichondrium during endochondral ossification. *The journal of histochemistry and cytochemistry : official journal of the Histochemistry Society*. 2010;58(5):455-62.
213. Hosoya A, Hiraga T, Ninomiya T, Yukita A, Yoshida K, Yoshida N, et al. Thy-1-positive cells in the subodontoblastic layer possess high potential to differentiate into hard tissue-forming cells. *Histochemistry and cell biology*. 2012;137(6):733-42.
214. Aslan H, Zilberman Y, Kandel L, Liebergall M, Oskouian RJ, Gazit D, et al. Osteogenic differentiation of noncultured immunoisolated bone marrow-derived CD105+ cells. *Stem cells*. 2006;24(7):1728-37.
215. Dennis JE, Esterly K, Awadallah A, Parrish CR, Poynter GM, Goltry KL. Clinical-scale expansion of a mixed population of bone-marrow-derived stem and progenitor cells for potential use in bone-tissue regeneration. *Stem cells*. 2007;25(10):2575-82.
216. Jarocha D, Lukasiewicz E, Majka M. Advantage of mesenchymal stem cells (MSC) expansion directly from purified bone marrow CD105+ and CD271+ cells. *Folia histochemica et cytobiologica*. 2008;46(3):307-14.
217. Jiang T, Liu W, Lv X, Sun H, Zhang L, Liu Y, et al. Potent in vitro chondrogenesis of CD105 enriched human adipose-derived stem cells. *Biomaterials*. 2010;31(13):3564-71.
218. Umeda K, Zhao J, Simmons P, Stanley E, Elefanty A, Nakayama N. Human chondrogenic paraxial mesoderm, directed specification and prospective isolation from pluripotent stem cells. *Scientific reports*. 2012;2:455.
219. Craft AM, Rockel JS, Nartiss Y, Kandel RA, Alman BA, Keller GM. Generation of articular chondrocytes from human pluripotent stem cells. *Nature biotechnology*. 2015;33(6):638-45.
-

220. Jones EA, Kinsey SE, English A, Jones RA, Straszynski L, Meredith DM, et al. Isolation and characterization of bone marrow multipotential mesenchymal progenitor cells. *Arthritis and rheumatism*. 2002;46(12):3349-60.
221. Murphy JM, Dixon K, Beck S, Fabian D, Feldman A, Barry F. Reduced chondrogenic and adipogenic activity of mesenchymal stem cells from patients with advanced osteoarthritis. *Arthritis and rheumatism*. 2002;46(3):704-13.
222. Archer CW, Francis-West P. The chondrocyte. *The international journal of biochemistry & cell biology*. 2003;35(4):401-4.
223. Cooke MJ, Phillips SR, Shah DS, Athey D, Lakey JH, Przyborski SA. Enhanced cell attachment using a novel cell culture surface presenting functional domains from extracellular matrix proteins. *Cytotechnology*. 2008;56(2):71-9.
224. Hall BK. *Bones and Cartilage: Developmental and Evolutionary Skeletal Biology* 2nd Edition 2015. 920 p.
225. Puelacher WC, Kim SW, Vacanti JP, Schloo B, Mooney D, Vacanti CA. Tissue-engineered growth of cartilage: the effect of varying the concentration of chondrocytes seeded onto synthetic polymer matrices. *International journal of oral and maxillofacial surgery*. 1994;23(1):49-53.



## **IV. ANEXOS**





## ANEXO A



**XUNTA DE GALICIA**  
CONSELLERÍA DE SANIDADE



**SERVIZO GALEGO de SAÚDE**  
Xerencia Xestión Integrada A Coruña

## HOJA DE INFORMACIÓN PARA EL PARTICIPANTE

**TÍTULO PROYECTO:** “Creación de modelos humanos celulares de artrosis (de rodilla, cadera y manos) y modelos humanos celulares sanos generados en células madre pluripotentes inducidas (iPS)”.

**IDENTIDAD INVESTIGADOR PRINCIPAL PROYECTO:** Dra. Silvia María Díaz Prado y Dr. Isaac Fuentes Boquete.

**IDENTIDAD RESPONSABLE GRUPO INVESTIGACIÓN:** Dr. Francisco Javier Blanco García.

**SERVICIO MÉDICO/GRUPO INVESTIGACIÓN:** Grupo de Investigación de Reumatología. Servicio de Reumatología. Xerencia Xestión Integrada A Coruña (XXIAC) – Instituto de Investigación Biomédica A Coruña (INIBIC).

**D. / Dña.:** .....

*(Espacio para colocar la etiqueta con los datos del donante muestra)*

## INTRODUCCIÓN.

Le proponemos participar en el proyecto de investigación titulado: “Creación de modelos humanos celulares de artrosis (de rodilla, cadera y manos) y modelos humanos celulares sanos generados en células madre pluripotentes inducidas (iPS)”. Este proyecto tiene como finalidad la creación de iPS a partir de fibroblastos de donantes sanos y pacientes afectados de artrosis. Estas iPS se emplearán como modelos celulares in vitro de artrosis y sanos de gran utilidad en farmacología para testar el efecto de nuevos fármacos para el tratamiento de la artrosis.

Toda investigación biomédica sobre enfermedades requiere recoger datos y muestras biológicas de personas afectadas por la patología a estudiar y de personas no afectadas por dicha enfermedad para analizarlas y obtener conclusiones para conocer mejor y avanzar en el diagnóstico y/o tratamiento de las enfermedades que se van a investigar. Las muestras obtenidas para el diagnóstico o control de las enfermedades, una vez utilizadas con esta finalidad, resultan también útiles y necesarias para la investigación.

Siguiendo lo establecido por la Ley 14/2007, de Investigación Biomédica, la Ley Orgánica 15/1999, de Protección de Datos Personales, y sus normas de desarrollo, le solicitamos que lea detenidamente este documento de información y el consentimiento informado que se le adjunta al final para su firma.

Este documento se le proporciona con el fin de darle información suficiente para que pueda entender los posibles riesgos y beneficios derivados de su participación en este proyecto de investigación, decidiendo si desea participar. Antes de tomar su decisión, lea atentamente este documento y haga

tantas preguntas como desee hasta asegurarse de que lo ha entendido y desea participar.

### **¿Cuál es el propósito del estudio?**

El trabajo que vamos a llevar a cabo está diseñado para ayudar a comprender mejor las enfermedades reumáticas y, en particular, la artrosis de rodilla, cadera y manos. Este trabajo nos permitirá mejorar el tratamiento farmacológico y el manejo clínico de esta enfermedad. En el laboratorio, utilizaremos nuevas tecnologías para producir un nuevo tipo de células madre. Estas células se denominan *células madre pluripotentes inducidas* y pueden fabricarse a partir de células donadas provenientes de biopsias de la piel. Una vez fabricadas las células madre, el siguiente paso en el laboratorio será transformarlas en células propias del cartílago, es decir, en condrocitos, mediante un proceso que se denomina de diferenciación condrogénica. Durante este proceso que nos llevará a crear células del cartílago, haremos pruebas para analizar la toxicidad de nuevos fármacos que pueden aplicarse a la artrosis

### **¿Por qué he sido invitado?**

Usted ha sido invitado a participar en este estudio porque su médico lo ha identificado como un candidato adecuado por pertenecer a alguno de los siguientes grupos:

- 1) Se le ha diagnosticado artrosis que le afecta a la rodilla, o a la cadera o a las manos. La donación de las células en este caso, nos ayudará a lograr el objetivo de comprender mejor su enfermedad.
- 2) Usted no tiene una enfermedad artrósica, pero es un familiar directo de un participante. Si sólo investigamos lo que ocurre en las células de los participantes con artrosis no tendríamos la posibilidad de contrastar los resultados. La donación de las células en su caso, nos da la oportunidad de descubrir las diferencias entre las células afectadas y las células sanas. Al estar directamente relacionado con un participante (es decir, hermano/a, madre, padre) los resultados obtenidos serán mejores, ya que usted sería genéticamente similar al participante afectado y eso facilitará a los científicos hacer buenas conclusiones del trabajo.

***Su participación en este proyecto de investigación es totalmente voluntaria. Si firma el consentimiento informado, confirmará que desea participar. Puede negarse a participar o retirar su consentimiento en cualquier momento posterior a la firma sin tener que explicar los motivos. En caso de decidir retirar el consentimiento, deberá tener en cuenta que sus células serán consideradas “ya utilizadas” una vez que los investigadores comiencen a inducir (fabricar) a las células madre pluripotentes, por lo que es importante tomar la decisión antes de que sus células lleguen al laboratorio. Si nos encontráramos en este último supuesto, usted podría solicitar la anonimización de las células generadas desde sus muestras, es decir, que se rompa la relación entre sus datos identificativos y las células inducidas. Su no-participación o retirada posterior del consentimiento no afectará en modo alguno a su atención sanitaria presente o futura.***

Las muestras obtenidas serán utilizadas en el proyecto de investigación antes mencionado cuyos investigadores principales son la Dra. Silvia María Díaz Prado y el Dr. Isaac Manuel Fuentes Boquete del **Instituto de Investigación Biomédica de A Coruña (INIBIC) - Xerencia Xestión Integrada A Coruña (XXIAC)**.

***Debe saber que la realización de este proyecto de investigación en el que se utilizarán sus muestras, ha sido autorizada por el Comité de Ética competente.***

Lo que le solicitamos es AUTORIZACIÓN para obtener, dentro del proyecto de investigación que le hemos descrito:

- **UNA BIOPSIA DE PIEL**: Necesitamos obtener un pequeño trozo de su piel, de un tamaño similar a la cabeza de una cerilla, que se le extraerá de una zona no visible aplicándole anestesia local para evitarle cualquier dolor innecesario.
- **INFORMACIÓN CLÍNICA** que nos permita analizar conjuntamente los resultados clínicos y los resultados derivados de las técnicas con las que se analicen las muestras.

Para el buen desarrollo de los estudios de investigación, es necesario obtener datos clínicos relativos al donante de las muestras, por lo que necesitaremos acceder a su historia clínica para recabar la información que será conservada junto a la muestra.

Las condiciones de conservación y uso de dicha información serán las indicadas en el apartado de Confidencialidad de este documento.

Las muestras y la información asociada a las mismas se guardarán para realizar este estudio de investigación biomédica, sin que este hecho le cause molestias adicionales al propio proceso asistencial. Las muestras y la información asociada a las mismas se almacenarán en las áreas establecidas para tal fin, dentro de las instalaciones de la XXIAC, bajo la responsabilidad de la Dra. Silvia María Díaz Prado y el Dr. Isaac Fuentes Boquete.

Es muy importante subrayar que, ***intentaremos minimizar las molestias que a usted le pudiera generar la donación de células realizando este procedimiento durante alguna consulta programada para su atención sanitaria de rutina.***

***La donación de estas muestras no impedirá que usted o su familia puedan usarlas cuando sea necesario por motivos de salud, siempre que estén disponibles.***

#### **RIESGOS – POSIBLES INCONVENIENTES.**

La obtención de las muestras antes descritas se realizará aprovechando una de sus visitas programadas a nuestro servicio, dentro de la atención sanitaria que le proporcionamos. Usted no sufrirá ningún riesgo grave por participar con nosotros en esta investigación, pero la biopsia es un procedimiento específico que se le efectuará por participar en este estudio.

La obtención de la pequeña muestra de piel que necesitamos, en ocasiones puede ocasionar alguna infección, sangrado, mala cicatrización o pequeñas molestias en la zona, que se reducirán tomando un analgésico o antibiótico común, dependiendo del

caso. En algunos supuestos puede quedar una mínima cicatriz difícilmente visible, dado que la cicatrización depende de diversos componentes particulares de cada persona.

No obstante, ante posibles riesgos que se puedan presentar en la realización ***de este estudio se ha contratado un seguro de responsabilidad civil con la empresa ....., póliza número: ....., que cubre cualquier evento adverso, inesperado o accidente, que se produzca durante el desarrollo de esta investigación y a consecuencia de la misma.***

#### **COMPENSACIÓN Y BENEFICIOS.**

Usted no obtendrá ningún beneficio económico directo por su participación en los estudios de investigación que se lleven a cabo con sus muestras, ni tendrá derechos sobre posibles beneficios comerciales de los descubrimientos que puedan conseguirse como resultado de la investigación biomédica.

La posibilidad de estudiar sus muestras, puede beneficiar en el futuro a pacientes con la misma enfermedad que se estudia en esta investigación o enfermedades relacionadas con la misma. No obstante, dado que las investigaciones pueden durar años, es posible que usted no obtenga un beneficio directo de los resultados.

#### **CONFIDENCIALIDAD.**

Toda la información que se obtenga de analizar sus muestras, así como toda la información clínica referente a usted utilizada en esta investigación, será considerada confidencial y tratada en consecuencia, de acuerdo con lo establecido en la Ley Orgánica 15/1999, de 13 de Diciembre, de Protección de Datos de Carácter Personal (LOPD), la Ley 14/2007, de 3 de Julio de Investigación Biomédica (LIBM) y las normas de desarrollo de ambas leyes.

Para garantizar la confidencialidad de su identidad (asegurar que la información de su muestra no se relaciona con su identidad), su muestra sólo irá identificada desde su entrada en el proyecto de investigación, con un código. Sólo este código, y nunca su identidad aparecerá en el material con el que se trabaje. La relación entre su código y su identidad, quedará custodiada por el personal autorizado del Grupo de Investigación de Reumatología, *Servicio de Reumatología de la XXIAC-INIBIC*, liderado por el Dr. Francisco Javier Blanco García, y del que forman parte los dos investigadores principales de este proyecto, en una base de datos de gestión de información que cumple todos los requisitos legales exigidos, tanto por la LOPD como por la LIBM y las normativas que las desarrollan. En base a todo ello, le informamos que se adoptarán todas las medidas necesarias para que tal información, no esté disponible salvo para el personal autorizado, el cual tiene el **deber legal de guardar secreto**. De esta manera podemos asegurar que cualquier información que se obtenga a partir de sus muestras, permanezca confidencial pero pueda ser asociada a sus datos, por si fuera información de interés clínico.

Es importante que entienda, que sus muestras y los datos asociados a las mismas en ocasiones deben ser enviadas a otros investigadores, nacionales o internacionales, que pertenezcan a centros colaboradores, ubicados en ocasiones en territorio nacional y en otras en el extranjero. En todo caso, le

informamos que las indicadas **cesiones siempre se efectuarán de un modo no identificable**, es decir, sólo se cederá la muestra asociada a **datos genéricos** (sexo, patología, peso, edad,...) **y codificados**, que evitarán que el receptor de la muestra pueda conocer su identidad. A todos ellos se les exigirá que nos garanticen que trabajarán con el mismo nivel de protección de datos exigido por la normativa española de protección de datos de carácter personal, y que, nos proporcionen información referente a la trazabilidad de la muestra y, nos notifiquen la destrucción o devolución de la muestra sobrante, una vez finalizados los estudios que a ellos les correspondan hacer. Usted puede autorizarnos o no a realizar las cesiones aquí indicadas, indicando su decisión en el apartado correspondiente de la hoja de firma del consentimiento informado.

Por otro lado, es posible que los resultados de las investigaciones sean publicados en la literatura científica, pero entendiendo estos resultados como los obtenidos de la totalidad de las muestras, no los resultados individuales. Si este fuera el caso, su identidad permanecerá completamente confidencial y nunca formará parte de ninguna publicación.

Con su aceptación a participar en este estudio de investigación, usted accede a que esta información pueda ser transferida en las mencionadas condiciones.

Puede ejercitar los **DERECHOS ACCESO, RECTIFICACIÓN, CANCELACIÓN Y/O OPOSICIÓN (DERECHOS ARCO)** que le reconoce la normativa española de protección de datos, dirigiendo su solicitud por escrito junto a una copia de su DNI (con el fin de garantizar que el ejercicio de estos derechos es realizado por la persona autorizada para ello) a:

- **ENTREGA EN PERSONA**, en la Secretaría del Servicio de Reumatología., a la atención del Dr. Francisco Javier Blanco García.
- **CORREO POSTAL:**
- Dr. Francisco Javier Blanco García.  
Grupo de Investigación de Reumatología  
Servicio de Reumatología de la *XXIAC-INIBIC*  
Planta 3ª, Hospital Universitario de A Coruña  
Xerencia Xestión Integrada A Coruña  
As Xubias, 84. A Coruña. 15006

Si usted decide **REVOCAR SU CONSENTIMIENTO**, deberá hacernos llegar al Servicio de Reumatología de la XXIAC, a la atención del Dr. Francisco Javier Blanco García, la hoja de revocación totalmente cubierta y firmada que aparece al final de este documento.

Una vez cubiertos todos los campos puede hacérsela llegar de cualquiera de las maneras descritas anteriormente.

**INFORMACIÓN ADICIONAL.** Usted puede contactar con el/la responsable de este estudio, Dr. Francisco Javier Blanco García, si le surge cualquier duda sobre su participación en esta investigación o sobre sus derechos como paciente, en el **Teléfono: 981 17 63 99**. En todo momento se pondrán los medios necesarios para facilitarle la información más adecuada.

**NUEVOS HALLAZGOS Y RESULTADOS.**

La evaluación de los resultados se hará sólo por grupos (por ejemplo, hombres / mujeres, grupos de edad, diagnósticos, etc.) y no de forma individual. Debe comprender que los resultados de valor que se pudieran obtener provendrían del estudio de múltiples muestras, y en ningún caso de la suya exclusivamente.

Las implicaciones médicas de los resultados de las distintas pruebas, si es que los hay, sólo serán conocidas cuando se haya completado la investigación.

***Usted debe saber que, en cumplimiento de la LIBM, tiene derecho a conocer o no, la información obtenida con el análisis de sus muestras.***

***En el caso de que usted decida no ser informado, la ley establece que cuando la información obtenida sea necesaria para evitar un grave perjuicio para la salud de sus familiares biológicos, un Comité de expertos estudiará el caso y deberá decidir entre la conveniencia o no de informar a los afectados o a sus representantes legales.***

**DESTINO DE LA MUESTRA UNA VEZ FINALIZADO EL PROYECTO DE INVESTIGACION.**

El remanente de su muestra y de las muestras derivadas del estudio de la misma, serán almacenadas durante la duración de este estudio por si fuera necesario realizar nuevas pruebas.

Una vez finalizado el estudio, las células creadas serán anonimizadas y depositadas en el Banco Nacional de Líneas Celulares del Instituto de Salud Carlos III. <http://www.isciii.es/ISCIII/es/contenidos/fd-el-instituto/fd-organizacion/fd-estructura-directiva/fd-subdireccion-general-investigacion-terapia-celular-medicina-regenerativa/fd-centros-unidades/banco-nacional-lineas-celulares.shtml>.

El envío de las muestras celulares anonimizadas al Banco Nacional de Líneas Celulares del Instituto de Salud Carlos III es obligatorio por lo que si acepta participar en el estudio no podrá negarse a este depósito final de las células en el indicado Banco.

**INFORMACIÓN DISPONIBLE PARA EL PARTICIPANTE.**

La persona responsable del proyecto de investigación tendrá a disposición de los participantes la información sobre el proyecto de investigación en el que se utilice las muestras y datos.



**XUNTA DE GALICIA**  
CONSELLERÍA DE SANIDADE



**SERVIZO  
GALEGO  
de SAÚDE** | Xerencia Xestión Integrada  
A Coruña

## CONSENTIMIENTO INFORMADO DEL PARTICIPANTE MAYOR DE EDAD

**Nombre y apellidos del participante:** .....

*(Espacio para colocar la etiqueta con los datos del donante muestra)*

**Si ha comprendido la información que se le ha proporcionado, ha resuelto cualquier duda que pudiese tener y decide colaborar con el Proyecto de Investigación titulado: “Creación de modelos humanos celulares de artrosis (de rodilla, cadera y manos) y modelos humanos celulares sanos generados en células madre pluripotentes inducidas (iPS)” en los términos indicados en el documento informativo que se le entrega junto con este consentimiento, por favor, lea y firme a continuación esta hoja.**

Si no está de acuerdo con alguno de los apartados nos lo puede indicar marcando la casilla NO correspondiente.

**Si firma esta hoja sin marcar ningún NO, entenderemos que acepta todo lo aquí indicado.**

Entiendo que participar en este estudio implica la creación de unas líneas celulares que al finalizar el mismo serán anonimizadas y depositadas en el Banco Nacional de Líneas Celulares del Instituto de Salud Carlos III.

**Presto libremente mi conformidad para participar en este Proyecto de Investigación** y autorizo a que obtengan las muestras indicadas en la hoja de información que me han facilitado y a que consulten y obtengan información de mis datos clínicos.

- Acepto que contacten conmigo cuando sea necesario: NO
- Quiero ser informado de los resultados de las investigaciones que sean de interés para mi salud: NO

**Teléfono / E-mail de contacto:**

.....

**CESIONES:** Autorizo a que mis muestras y datos sean cedidas, en las condiciones indicadas, para la realización de este proyecto de investigación:

COMUNITARIAS NO

EXTRACOMUNITARIAS NO

Firma del participante

Firma del responsable

Identidad del participante: ..... Identidad del responsable: .....

Firma del testigo

Da fe del consentimiento verbal del participante, el cual lo autoriza a firmar en su nombre

Identidad del testigo: .....

DNI: .....

*Solo se firmará en aquellos casos en los que el participante no pueda leer y/o escribir y delegue la firma en el testigo.*

En ....., a ..... de ..... de .....

***Le agradecemos su desinteresada colaboración con el avance de la ciencia y la medicina.***





XUNTA DE GALICIA  
CONSELLERÍA DE SANIDADE



SERVIZO  
GALEGO  
de SAÚDE | Xerencia Xestión Integrada  
A Coruña

### REVOCACIÓN DEL CONSENTIMIENTO

Yo, D./Dña.....con DNI .....revoco el  
consentimiento prestado en fecha.....de.....de 20..... Y no deseo proseguir la donación  
voluntaria, que doy con esta fecha por finalizada.

- ☐ SOLICITO ELIMINACIÓN SOLO DE LAS MUESTRAS.
- ☐ SOLICITO ELIMINACIÓN SOLO DE MIS DATOS PERSONALES.
- ☐ SOLICITO ELIMINACIÓN TOTAL DE MIS DATOS Y MUESTRAS.

Fdo.:

En.....a.....de.....de 20.....



## ANEXO B



Subdirección General de Investigación  
en Terapia Celular y Medicina Regenerativa



D<sup>a</sup>. Rocío Mosquera Álvarez  
Consejería de Sanidad  
Xunta de Galicia  
Edificio Administrativo de San Lázaro  
15703 Santiago de Compostela – A coruña

Madrid, a 14 de abril de 2015

La Comisión de Garantías para la Donación y Utilización de Células y Tejidos Humanos, en base a lo acordado en la reunión de 13 de abril de 2015, y bajo la presidencia del Director del Instituto de Salud Carlos III, acordó informar el siguiente proyectos presentado por ese Departamento:

**335 282 1 Creación de modelos humanos celulares de artrosis (rodilla, cadera y manos) y modelos humanos celulares sanos generados en células madre pluripotentes inducidas (IPS)**

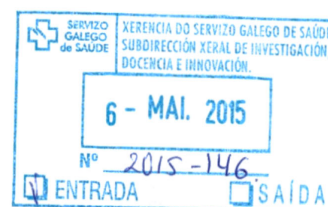
Se informa favorablemente.

Se le recuerda la obligación de remitir a esta Comisión un breve informe anual sobre la evolución de los proyectos, indicando posibles publicaciones o comunicaciones a congresos.

Todo lo cual pongo en su conocimiento en cumplimiento de lo dispuesto en la Ley 14/2007 de 4 de julio de Investigación Biomédica.

Atentamente,

Javier Arias Díaz  
Secretario de la Comisión de Garantías para la Donación  
Y Utilización de Células y Tejidos Humanos



Monforte de Lemos, núm. 5  
28020 Madrid

Teléfono 91 8222103 / 86  
Fax 01 8222112



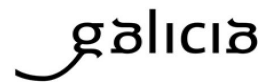


## ANEXO C



**XUNTA DE GALICIA**  
CONSELLERÍA DE SANIDADE  
Secretaría Xeral Técnica

Secretaría Técnica  
Comité Autonómico de Ética da Investigación de Galicia  
Secretaría Xeral. Consellería de Sanidade  
Edificio Administrativo San Lázaro  
15703 SANTIAGO DE COMPOSTELA  
Tel: 881 546425; ceic@sergas.es



## DICTAMEN DEL COMITÉ DE ÉTICA DE LA INVESTIGACIÓN DE A CORUÑA-FERROL

Carlos Rodríguez Moreno, Secretario del Comité de Ética de la Investigación de A Coruña-Ferrol

### CERTIFICA:

Que este Comité evaluó en su reunión del día 21/01/2015 el estudio:

**Título:** Creación de modelos humanos celulares de artrosis (de rodilla, cadera y manos) y modelos humanos celulares sanos generados en células madre pluripotentes inducidas (iPS).

**Promotor:** Silvia Mª Díaz Prado, Isaac Manuel Fuentes Boquete

**Tipo de estudio:** Otros

**Version:**

**Código del Promotor:**

**Código de Registro:** 2014/405

Y, tomando en consideración las siguientes cuestiones:

- La pertinencia del estudio, teniendo en cuenta el conocimiento disponible, así como los requisitos legales aplicables, y en particular la Ley 14/2007, de investigación biomédica, el Real Decreto 1716/2011, de 18 de noviembre, por el que se establecen los requisitos básicos de autorización y funcionamiento de los biobancos con fines de investigación biomédica y del tratamiento de las muestras biológicas de origen humano, y se regula el funcionamiento y organización del Registro Nacional de Biobancos para investigación biomédica, la ORDEN SAS/3470/2009, de 16 de diciembre, por la que se publican las Directrices sobre estudios Posautorización de Tipo Observacional para medicamentos de uso humano, y el la Circular nº 07 / 2004, investigaciones clínicas con productos sanitarios.
- La idoneidad del protocolo en relación con los objetivos del estudio, justificación de los riesgos y molestias previsibles para el sujeto, así como los beneficios esperados.
- Los principios éticos de la Declaración de Helsinki vigente.
- Los Procedimientos Normalizados de Trabajo del Comité.

Emite un **INFORME FAVORABLE** para la realización del estudio por el/la investigador/a del centro:

Centros	Investigadores Principales
C.H.U de A Coruña	Silvia Mª Díaz Prado, Isaac Manuel Fuentes Boquete

En Santiago de Compostela, a  
El secretario



carlos.rodriguez.  
moreno@sergas.  
es

Firmado digitalmente por carlos.  
rodriguez.moreno@sergas.es  
Nombre de reconocimiento (DN):  
cn=carlos.rodriguez.  
moreno@sergas.es  
Fecha: 2015.01.26 09:15:11 +01'00'